

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-100102
(43)Date of publication of application : 13.04.2001

(51)Int.Cl.

(21)Application number : 10-097924

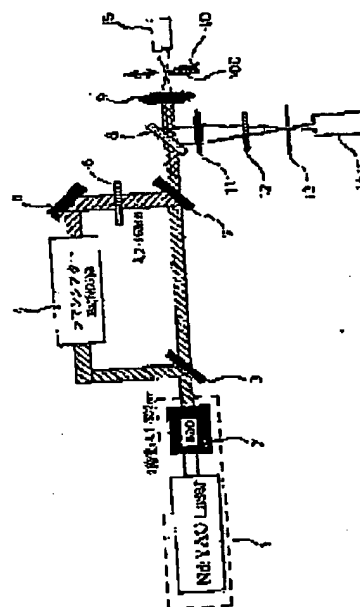
(22)Date of filing : 09.04.1998

(54) MICROSCOPIC SYSTEM

(57)Abstract:

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new microscopic system capable of condensing erase light for exciting a molecule in a 1st electronic exciting state to a 2nd electronic exciting state by using a simple and compact optical system in excellent beam profile, making stability and operability high and having excellent super resolution.

SOLUTION: This system is equipped with the light source of wavelength λ_1 light for exciting the molecule from a base state to the 1st electronic exciting state, the light source of wavelength λ_2 light for exciting the molecule in the 1st electronic exciting state to the 2nd electronic exciting state or a higher electronic exciting state, a condensing optical system condensing the wavelength λ_1 light and the wavelength λ_2 light on an adjusted sample, and a superposing means for partially superposing an irradiation area by the wavelength λ_1 light and an irradiation area by the wavelength λ_2 light on the adjusted sample. By radiating the wavelength λ_1 light and the wavelength λ_2 light through the superposing means, a light emitting region in the case of de-exciting the molecule from the 1st electronic exciting state to the base state is restrained.



LEGAL STATUS

LEGAL STATUS
[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

BEST AVAILABLE COPY

MAY. 23. 2005 4:42PM
Searching PAJ

+1-212-319-5101 customer 01933

NO. 6097 P. 21

[Patent number]

3350442

[Date of registration]

13.09.2002

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-100102
(P2001-100102A)

(43) 公開日 平成13年4月13日 (2001.4.13)

(51) Int. Cl.
G 0 2 B 21/00
21/06

識別記号

FI
G 0 2 B 21/00
21/06ページ数 (参考)
2 H 0 5 2

審査請求 有 請求項の数 51 OL (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願平10-97924
(22) 出願日 平成10年4月9日 (1998.4.9)(71) 出願人 398020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番9号
(71) 出願人 000000376
オリンパス光学工業株式会社
東京都渋谷区橋ヶ谷2丁目43番2号
(72) 発明者 池端 慶司
東京都青梅市河辺町4-21-5 カサヴェ
ール河辺206
(72) 発明者 藤井 正明
神奈川県横浜市青葉区みたけ台25-43
(74) 代理人 100093230
弁理士 西澤 利夫

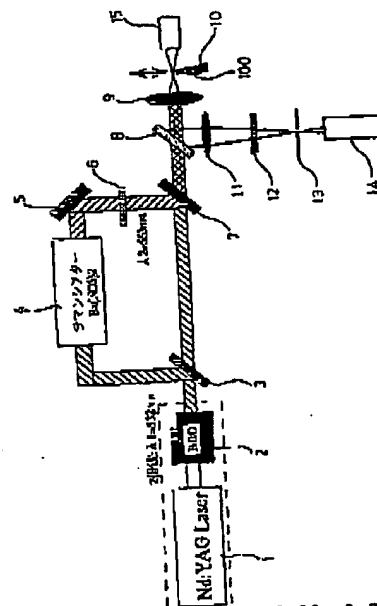
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 顕微鏡システム

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態へ励起させるイレーズ光を、簡単にコンパクトな光学系を用いて、優れたビームプロファイルで集光させることができ、安定性および操作性が高く、優れた超解像性を有する、新しい顕微鏡システムを提供する。

【解決手段】 分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させる波長λ1光の光源と、第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態またはより高い電子励起状態へ励起させる波長λ2光の光源と、波長λ1光と波長λ2光とを調整された試料上に集光させる集光光学系と、調整された試料上における波長λ1光の照射領域および波長λ2光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段とを備え、重ね手段を介して波長λ1光と波長λ2光とを照射することにより、分子が第一電子励起状態から基底状態へ脱励起する際の発光の領域を抑制する。



BEST AVAILABLE COPY

(2) 001-100102 (P2001-100102A)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 調整された試料と顕微鏡本体とを備えた顕微鏡システムであって、

調整された試料は、少なくとも基底状態を含め3つの電子状態を有し、その第一電子励起状態から第二電子励起状態への励起波長帯域が、第一電子励起状態から基底状態への振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光波長帯域と重複している分子により染色されたものであり、顕微鏡本体は、

分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させる波長入1光の光源と、

第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態またはより高い電子励起状態へ励起させる波長入2光の光源と、

波長入1光と波長入2光とを調整された試料上に集光させる集光光学系と、

調整された試料上における波長入1光の照射領域および波長入2光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段と、

励起された分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する発光検出器とを備え、

重ね手段を介して波長入1光と波長入2光とを照射することにより、分子が第一電子励起状態から基底状態へ脱励起する際の発光の領域を抑制するものであることを特徴とする光学顕微鏡システム。

【請求項2】 調整された試料と顕微鏡本体とを備えた顕微鏡システムであって、

調整された試料は、少なくとも基底状態を含め3つの電子状態を有する分子により染色されたものであり、顕微鏡本体は、

分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させる波長入1光の光源と、

第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態またはより高い電子励起状態へ励起させる波長入2光の光源と、

波長入1光と波長入2光とを調整された試料上に集光させる集光光学系と、

調整された試料上における波長入1光の照射領域および波長入2光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段と、

励起された分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する発光検出器とを備え、

重ね手段を介して波長入1光と波長入2光とを照射することにより、分子が第一電子励起状態から基底状態へ脱励起する際の発光の領域を抑制するものであり、

波長入2光を集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内で、光軸に関する対称位置においてπだけ位相がずれた位相分布を有していることを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項3】 調整された試料と顕微鏡本体とを備えた顕微鏡システムであって、

調整された試料は、少なくとも基底状態を含め3つの電

子状態を有し、その第一電子励起状態から第二電子励起状態への励起波長帯域が、第一電子励起状態から基底状態への振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光波長帯域に重複している分子により染色されたものであり、

顕微鏡本体は、

分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させる波長入1光の光源と、

第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態またはより高い電子励起状態へ励起させる波長入2光の光源と、波長入1光と波長入2光とを調整された試料上に集光させる集光光学系と、

調整された試料上における波長入1光の照射領域および波長入2光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段と、

励起された分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する発光検出器とを備え、

重ね手段を介して波長入1光と波長入2光とを照射することにより、分子が第一電子励起状態から基底状態へ脱励起する際の発光の領域を抑制するものであり、

波長入2光を集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内で、光軸に関する対称位置においてπだけ位相がずれた位相分布を有していることを特徴とする顕微鏡システム。

【請求項4】 第一電子励起状態から第二電子励起状態への励起波長帯域と基底状態から第一電子励起状態への励起波長帯域とが異なる請求項1ないし3のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項5】 分子が、六員環を一つまたは複数含む分子である請求項1ないし4のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項6】 六員環が、ベンゼン環またはプリン塩基である請求項5の顕微鏡システム

【請求項7】 分子が、六員環誘導体を一つまたは複数含む分子である請求項1ないし4のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項8】 六員環誘導体が、ベンゼン誘導体またはプリン誘導体である請求項7の顕微鏡システム。

【請求項9】 分子が、キサンチン系分子、ローダミン系分子、オキサジン系分子、シアニン系分子、クマリ系分子、オキサゾール系分子、オキサジアゾール系分子、スチルベン系分子のいずれかである請求項5ないし8のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項10】 分子が、以下の分子のいずれかである請求項9の顕微鏡システム。2,2'-Dimethyl-p-terphenyl: P-terphenyl (PTP); 3,3',2'',3'''-Tetramethyl-P-terphenyl: 2,2'''-Dimethyl-P-quaterphenyl: 2-Me quaterphenyl: 2,2'''-Dimethyl-P-quaterphenyl: 2-(4-Biphenyl)-5-thyl-5-t-butyl-p-quaterphenyl: 2-(4-Biphenyl)-5-thyl-5-t-butyl-p-quaterphenyl: 2-(4-Biphenyl)-5-thyl-5-t-butyl-p-quaterphenyl: 1,3,4-oxiazol (BPBD-365): 2-(4-Biphenyl)-phenyl-1,3,4-oxadiazol: 2,5,2''',5'''-Tetramethyl-p-quaterphenyl: 3,5,3''',5'''-Tetra-

(3) 001-100102 (P2001-100102A)

t-butyl-p-quinquephenyl: 2,5-Diphenyloxazol: 2,5-Diphenylfuran: PQP(p-Quaterphenyl): 2,5-Bis-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol: p-Quaterphenyl-4,4''-disulfonicacid Disodiumsalt: p-Quaterphenyl-4,4''-disulfonicacid Dipotassiumsalt: 4,4''-Bis-(2-butyl-octyloxy)-p-quaterphenyl: 3,5,3''',5'''-Tetra-butyl-p-sexiphenyl: 2-(1-Naphthyl)-5-phenyloxazol: 2-(4-Biphenyl)-6-phenylbenzoxazotetrasulfonicacid Potassium Salt: 2-(4-Biphenyl)-6-phenylbenzoxazol-1,3: 4,4''-Diphenylstilbene: (1,1'-Biphenyl)-4-sulfonic acid,4,4''-1,2-ethene-diylbis-dipotassium salt: 2,5-Bis-(4-biphenyl)-oxazol: 2,2'-((1,1'-Biphenyl)-4,4''-diyl)-2,1-ethenediyl)-bis-benzenesulfonic acid Disodium Salt: 7-Amino-4-methylcarbostyryl: 1,4-Di(2-(5-phenyloxazolyl))benzene; 7-Hydroxy-4-methylcoumarin: p-Bis(o-methylstyryl)-benzene: Benzofuran, 2,2'-[1,1'-biphenyl]-4,4''-diyl-bis-tetrasulfonic acid: 7-Dimethylamino-4-methylquinolone-2: 7-Amino-4-methylcoumarin: 2-(p-Dimethylaminostyryl)-pyridylmethyl iodide: 7-Diethylaminocoumarin: 7-Diethylamino-4-methylcoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-8-methylquinolizino-[9,9a,1-g]-coumarin: 7-Diethylamino-4-trifluormethylcoumarin: 7-Diethylamino-4-trifluormethylcoumarin: 7-Amino-4-trifluormethylcoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydroquinolizino-[9,9a,1-g]-coumarin: 7-Ethylamino-6-methyl-4-trifluormethylcoumarin: 7-Ethylamino-4-trifluormethylcoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-carboethoxyquinolizino-[9,9a,1-g]-coumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-(3-pyridyl)-quinolizino-[9,9a,1-g]-coumarin: 3-(2'-N-Methylbenzimidazolyl)-7-N,N-diethylaminocoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-acetylquinolizino-[9,9a,1-g]-coumarin: N-Methyl-4-trifluormethylpiperidino-[3,2-g]-coumarin: 2-(p-Dimethylaminostyryl)-benzothiazolylethyl iodide: 3-(2'-Benzimidazolyl)-7-N,N-diethylaminocoumarin: Brillantsulfaflavin: 3-(2'-Benzothiazolyl)-7-diethylaminocoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-8-trifluormethylquinolizino-[9,9a,1-g]-coumarin: 3,3'-Diethylloxacarboxyanine Iodide: 3,3'-Dimethyl-9-ethylthiacarbocyanine Iodide: Disodium Fluorescein(Uranin): 9-(o-Carboxyphenyl)-2,7-dichloro-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on,2,7-Dichlorofluorescein. Fluorescein 548: Fluorol 555(Fluorol 7GA): o-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)-benzoic acid(Rhodamine 560): Benzoic Acid, 2-[6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl],perchlorate(Rhodamine 575): Benzoic Acid, 2-[6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl],ethyl ester, monohydrochloride(Rhodamine 590): 1,3'-Diethyl-4,2'-quinolyloxacarboxyanine Iodide: 1,1'-Diethyl-2,2'-carbocyanine Iodide: 2-[6-(Diethylamino)-3-(ethylamino)-3H-xanthen-9-yl]benzoic acid(Rhodamine 610): Ethanaminium,N-[(6-diethylamino)-9-(2,4-disulfophenyl)-3H-xanthen-3-ylidene]-N-ethylhydroxid, inner salt, sodium salt: Malachit Green: 3,3'-Diethylthiacarbocyanine Iodide: 1,3'-Diethyl-4,2'-quinolythiacarbocyanine Iodide: 8-(2-Carboxyphenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a',1-hi]xanthylum Perchlorate(Rhodamine 640): 4-Dicyanmethylene-2-methyl-6-(p-dimethylaminostyryl)-4H-pyran: 3,3'-Diethylloxadibocyanine Iodide: 8-(2,4-Disulfophenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',1-hi]xanthene(Sulforhodamine 640): 5,9-Diaminobenzo(a)phenoxazinium Perchlorate: 9-Diethylamino-5H-benzo(a)phenoxazin-5-one: 5-Amino-9-diethylimino(a)phenoxazinump perchlorate: 3-Ethylamino-7-ethylimino-2,8-dimethylphenoxazin-5-ium Perchlorate: 8-(Trifluoromethyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a,1-hi]xanthylum Perchlorate: 1-Ethyl-2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: Carbazine 122: 9-Ethylamino-5-ethylimino-10-methyl-5H-benzo(a)phenoxazinium Perchlorate: 3-Diethylamino-7-diethyliminophenoxazinium Perchlorate: 3-Diethylthiadibocyanine Iodide: Oxazine 750: 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: 1,1',3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanine Iodide: 1,1'-Diethyl-4,4'-carbocyanine Iodide: 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-1,3,3-trimethyl-3H-indolium Perchlorate: 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-3-ethylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1'-Diethyl-2,2'-dicarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(9-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo(1,1-j)-chinolinozinium)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: 3,3'-Dimethylloxatricarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-quinolinium Perchlorate: 8-Cyano-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9a',1-hi]xanthylum Perchlorate(Rhodamine 80): 2-(6-(4-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindotricarbocyanine Iodide: IR 125: 3,3'-Diethylthiatricarbocyanine Iodide: IR 144: 2-(6-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H-benzo(1,1-j)-chinolinozinium)-2,4-neopentylene-1,3,5-hexatrienyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 3,3'-Diethyl-9,11-neopentyleneethiatricarbocyanine Iodide: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethyl-4,4',5,5'-dibenzo-2,2'-indole

ine Iodide: 1,1'-Diethyl-2,2'-carbocyanine Iodide: 2-[6-(Diethylamino)-3-(ethylamino)-3H-xanthen-9-yl]benzoic acid(Rhodamine 610): Ethanaminium,N-[(6-diethylamino)-9-(2,4-disulfophenyl)-3H-xanthen-3-ylidene]-N-ethylhydroxid, inner salt, sodium salt: Malachit Green: 3,3'-Diethylthiacarbocyanine Iodide: 1,3'-Diethyl-4,2'-quinolythiacarbocyanine Iodide: 8-(2-Carboxyphenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a',1-hi]xanthylum Perchlorate(Rhodamine 640): 4-Dicyanmethylene-2-methyl-6-(p-dimethylaminostyryl)-4H-pyran: 3,3'-Diethylloxadibocyanine Iodide: 8-(2,4-Disulfophenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',1-hi]xanthene(Sulforhodamine 640): 5,9-Diaminobenzo(a)phenoxazinium Perchlorate: 9-Diethylamino-5H-benzo(a)phenoxazin-5-one: 5-Amino-9-diethylimino(a)phenoxazinump perchlorate: 3-Ethylamino-7-ethylimino-2,8-dimethylphenoxazin-5-ium Perchlorate: 8-(Trifluoromethyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a,1-hi]xanthylum Perchlorate: 1-Ethyl-2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: Carbazine 122: 9-Ethylamino-5-ethylimino-10-methyl-5H-benzo(a)phenoxazinium Perchlorate: 3-Diethylamino-7-diethyliminophenoxazinium Perchlorate: 3-Diethylthiadibocyanine Iodide: Oxazine 750: 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: 1,1',3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanine Iodide: 1,1'-Diethyl-4,4'-carbocyanine Iodide: 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-1,3,3-trimethyl-3H-indolium Perchlorate: 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-3-ethylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1'-Diethyl-2,2'-dicarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(9-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo(1,1-j)-chinolinozinium)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: 3,3'-Dimethylloxatricarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-quinolinium Perchlorate: 8-Cyano-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9a',1-hi]xanthylum Perchlorate(Rhodamine 80): 2-(6-(4-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindotricarbocyanine Iodide: IR 125: 3,3'-Diethylthiatricarbocyanine Iodide: IR 144: 2-(6-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H-benzo(1,1-j)-chinolinozinium)-2,4-neopentylene-1,3,5-hexatrienyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 3,3'-Diethyl-9,11-neopentyleneethiatricarbocyanine Iodide: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethyl-4,4',5,5'-dibenzo-2,2'-indole

BEST AVAILABLE COPY

(4) 001-100102 (P2001-100102A)

tricarbocyanine Iodide: 3,3'-Diethyl-4,4',5,5'-dibenzothiatricarbocyanine Iodide: 1,2'-Diethyl-4,4'-dicarbocyanine Iodide: IR140: 2-(8-(4-p-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: IR132: 2-(8-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H,benzo(i,j)chinolizinium))-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: IR26: IR5

【請求項11】 波長入1光を集光して得られるビームの光軸と波長入2光を集光して得られるビームの光軸とが同軸である請求項1ないし10のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項12】 波長入2光を集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内において、光軸の周りを1回転したときに0から 2π まで連続的に変化する位相分布を有している請求項1ないし11のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項13】 波長入2光を集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内において、該光軸の周りを1回転したときに0から 2π まで不連続的に変化する位相分布を有している請求項1ないし11のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項14】 波長入2光を集光して得られるビームが、ベッセルビームである請求項1ないし13のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項15】 ベッセルビームが、一次のベッセルビームである請求項14の顕微鏡システム。

【請求項16】 波長入2光を集光して得られるビームが、ガウス型、ラグエル型またはエルミート型のいずれかの発振モードを持つレーザービームである請求項1ないし13のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項17】 波長入1光の光源として、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかが備えられている請求項1ないし16のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項18】 気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長が、波長入1である請求項17の顕微鏡システム。

【請求項19】 気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長の高調波が、波長入1である請求項17の顕微鏡システム。

【請求項20】 気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長とその高調波との和周波または差周波が、波長入1である請求項17の顕微鏡システム。

【請求項21】 波長入2光の光源として、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかが備えられている請求項1ないし20のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項22】 気体レーザー、固体レーザーまたは半

導体レーザーのいずれかの発振波長が、波長入2である請求項21の顕微鏡システム。

【請求項23】 気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長の高調波が、波長入2である請求項21の顕微鏡システム。

【請求項24】 気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長とその高調波との和周波または差周波が、波長入2である請求項21の顕微鏡システム。

【請求項25】 気体レーザーが、エキシマレーザー、銅蒸気レーザー、アルゴンレーザー、He-Neレーザー、CO₂レーザー、He-Cdレーザーまたは窒素レーザーのいずれかである請求項17ないし24のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項26】 気体レーザーが、モードロック型である請求項25の顕微鏡システム。

【請求項27】 固体レーザーが、Nd:YAGレーザー、Ti:サファイヤレーザー、YLFレーザーまたはルビーレーザーのいずれかである請求項17ないし24のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項28】 固体レーザーが、半導体レーザー励起型である請求項27の顕微鏡システム。

【請求項29】 固体レーザーが、モードロック型である請求項27または28の顕微鏡システム。

【請求項30】 顕微鏡本体が、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーからのレーザー光の波長変換を行うための非線形媒質または波長変調素子を、一つまたは複数有している請求項17ないし29のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項31】 非線形媒質または波長変調素子が、非線形結晶である請求項30の顕微鏡システム。

【請求項32】 非線形媒質または波長変調素子が、ラマンシフターである請求項30または31の顕微鏡システム。

【請求項33】 波長入1光が、気体レーザーまたは固定レーザーの基本波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものである請求項30ないし32のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項34】 波長入1光が、気体レーザーまたは固定レーザーの高調波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものである請求項30ないし32のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項35】 波長入2光が、気体レーザーまたは固体レーザーの基本波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものである請求項30ないし34のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項36】 波長入2光が、気体レーザーまたは固体レーザーの高調波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものである請求項30ないし34のいずれかの顕微鏡システム。

BEST AVAILABLE COPY

(5) 001-100102 (P2001-100102A)

【請求項37】 波長 λ 2光の集光光学系が、波長 λ 2光を集光して得られるビームにその光軸に対して直交する平面内で位相差分布を与える屈折率分布または光路差分布を有する位相板を備えている請求項1ないし36のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項38】 波長 λ 2光の集光光学系が、輪帯光学系を備えている請求項1ないし37のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項39】 波長 λ 2光の集光光学系が、回折光学系を備えている請求項1ないし37のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項40】 波長 λ 2光の集光光学系が、アキシコンを備えている請求項1ないし37のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項41】 気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーの共振器内に、リング状の輪帯ミラー、輪帯回折格子、フレネルゾーンプレート、輪帯アパーチャー、または光軸と直交する面内の電場に関して軸対称にある電場の互いに π だけずれた位相差を与える位相板のいずれかが、少なくとも一つ備えられている請求項1ないし36のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項42】 顕微鏡本体が、分子からの発光を発光検出器に集光する発光集光光学系を有している請求項1ないし41のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項43】 発光集光光学系が、シャープカットフィルタを備えている請求項42の顕微鏡システム。

【請求項44】 発光集光光学系が、ノッチフィルターを備えている請求項42の顕微鏡システム。

【請求項45】 発光集光光学系が、バンドパスフィルターを備えている請求項42の顕微鏡システム。

【請求項46】 バンドパスフィルターが、波長 λ 1光および波長 λ 2光を透過させず、分子からの発光を透過させるものである請求項45の顕微鏡システム。

【請求項47】 調整された試料が、波長 λ 1光および波長 λ 2光が透過する物質からなる封入手段により封入されている請求項1ないし46のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項48】 調整された試料が、波長 λ 1光および波長 λ 2光が透過する物質からなるカバー手段によりカバーされている請求項1ないし46のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項49】 前記物質が、合成石英 SiO_2 、 CaF_2 、 NaF 、 Na_3AlF_6 、 LiF 、 MgF_2 、 SiO_2 、 LaF_3 、 NdF_3 、 Al_2O_3 、 CeF_3 、 PbF_2 、 MgO 、 TbO_2 、 SnO_2 、 La_2O_3 、または SiO である請求項47または48の顕微鏡システム。

【請求項50】 顕微鏡本体は、波長 λ 1光と波長 λ 2光の光源とは別に、連続発振レーザーを備えており、この連続発振レーザーを調整された試料上に集光して得ら

れるビームが、その光軸と直交する面内で、光軸に関する対称位置において π だけ位相がずれる位相分布を有している請求項1ないし49のいずれかの顕微鏡システム。

【請求項51】 顕微鏡本体は、連続発振レーザーを調整された試料上に集光して得られるビームを、波長 λ 1光を集光して得られるビームおよび波長 λ 2光を集光して得られるビームとは独立して、調整された試料上を相対的に走査するための手段を有している請求項50のいずれかの顕微鏡システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、顕微鏡システムに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、染色された試料を複数の波長の光により照明することで、高い空間分解能の高画質画像を得ることができる、高性能、且つ高機能な、新しい顕微鏡システムに関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より、光学顕微鏡は、様々なタイプのものが開発されており、近年のレーザー技術および電子画像技術をはじめとする周辺技術の進歩にともない、その高機能化が盛んに行われている。このような高機能光学顕微鏡の一つとして、複数波長の光で試料を照明することによって発する二重共鳴吸収過程を用い、得られる画像のコントラストの制御のみならず化学分析も可能にする顕微鏡が提案されている（特願平6-329165）。

【0003】この光学顕微鏡は、二重共鳴吸収を用いて特定の分子を選択し、特定の光学遷移に起因する吸収および蛍光を観測することができる。まず、図1に例示した基底状態の分子がもつ価電子軌道2の電子を、図2に例示したように光照射により空軌道である価電子軌道3に励起させる。この状態が第一励起状態である。次に、図3に例示したように、別な波長の光を照射することにより価電子軌道1の電子を、価電子軌道2に生成された空孔に励起させる。この状態が第二励起状態である。分子は、この第二励起状態から、図4に例示したように蛍光あるいは燐光を発光したりして基底状態に戻る。そして、図2の吸収過程や図4の蛍光や燐光の発光を用いて、吸収像や発光像を観察する。

【0004】最初にレーザー光などにより共鳴波長 λ 1の光で試料を構成する分子を第一励起状態に励起させる際、単位体積内における第一励起状態の分子数は、照射する光の強度が増加するにしたがって増加する。線吸収係数は、分子一個あたりの吸収断面積と単位体積当たりの分子数との積で与えられるので、図3のような励起過程においては続いて照射する共鳴波長 λ 2に対する線吸収係数は最初に照射した λ 1の光の強度に依存する。

【0005】すなわち、波長 λ 2に対する線吸収係数は

BEST AVAILABLE COPY

(6) 001-100102 (P2001-100102A)

波長 λ_1 の光の強度で制御できる。このことは、波長 λ_1 および波長 λ_2 の二波長の光で試料を照射し、波長 λ_2 による透過像を撮影すれば、透過像のコントラストは波長 λ_1 の光量で完全に制御できることを示している。また、図3の第二励起状態よりの蛍光または燐光による第一励起過程が可能である場合には、その発光強度は第一励起状態にある分子数に比例する。従って、蛍光顕微鏡として利用する場合にも画像コントラストの制御が可能となる。

【0006】また、この従来の光学顕微鏡は、コントラストの制御のみならず、化学分析も可能にする。図1における最外殻価電子軌道は各々の分子に固有なエネルギーを持つので、波長 λ_1 は分子によって異なる。同時に波長 λ_2 も分子固有のものとなる。よって、波長 λ_1 および波長 λ_2 の二波長により吸収あるいは発光する分子を限定することができるので、正確な試料の化学組成の同定が可能となる。

【0007】さらには、価電子を励起する場合、分子軸に対して特定の電場ベクトルを持つ光のみが強く吸収されるので、波長 λ_1 および波長 λ_2 の偏光方向を決めて、吸収像または蛍光像を撮影すれば、同じ分子でも配向方向の同定も行うことができる。最近では、二重共鳴吸収過程を用いて回折限界を超える高い空間分解能を持つ蛍光顕微鏡も提案されている(特願平8-302232)。

【0008】図5は、分子における二重共鳴吸収過程を例示した概念図であり、基底状態の分子が、波長 λ_1 の光で第一励起状態に励起され、さらに λ_2 の光で第二励起状態に励起されており、この第二励起状態からの蛍光が、ある種の分子では極めて弱いことを示している。このような光学的性質を持つ分子では、極めて興味深い現象が起きる。図6は、横軸にX軸を設けて二重共鳴吸収過程における空間的距離の広がり为例示したものである。この図6においては、波長 λ_2 の光が照射されない空間領域A0と、波長 λ_2 の光が照射されない空間領域A1とが示されており、この空間領域A0では λ_1 光励起により第一励起状態の分子が多数生成される。このとき、空間領域A0からは波長 λ_3 で発光する蛍光が見られる。しかし、空間領域A1では、波長 λ_2 の光を照射したため第一励起状態のほとんどの分子が即座に高位の第二励起状態に励起され、第一励起状態の分子は存在しなくなる。このため、波長 λ_3 の蛍光は完全になくなり、しかも、第二励起状態からの蛍光はもととないの、空間領域A1では完全に蛍光自体が抑制されることとなる。従って、蛍光があるのは空間領域A0のみであることがわかる。

【0009】この結果は、顕微鏡の応用分野から考察すると、極めて重要な意味を持つ。すなわち、従来の走査型レーザ顕微鏡などでは、レーザ光を集光し、マイクロビームを形成して観察試料上を走査する。この時、マイ

クロビームのサイズは、集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界で決まり、原理的にそれ以上の空間分解能は期待できない。しかし、図6によれば、 λ_2 の照射で蛍光領域が抑制されているので、 λ_1 と λ_2 の二種類で波長を空間的に上手に重ね合わせることで、たとえば波長を空間的に上手に重ね合わせることで、たとえば波長 λ_1 の照射領域に着目すると、蛍光領域は集光レンズの開口数と波長とで決まるサイズよりも狭くなっており、実質的に空間分解能の向上が図られている。したがって、この原理を用いれば、回折限界を超える蛍光顕微鏡が可能となる。これが二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡である。

【0010】さらに、この顕微鏡の超解像性をさらに高めるために、新たな提案もされている(特願平9-255444)。すなわち、少なくとも基底状態を含め3つの量子状態を有し、且つ第一励起状態を除く高位の励起状態から基底状態へ脱励起するときの遷移において蛍光による緩和過程よりも熱緩和過程の方が支配的である各種分子を蛍光ラベラー分子として用い、この蛍光ラベラー分子と生化学的な染色技術を施した生体分子とを化学結合させてなる試料に波長 λ_1 の光を照射して、蛍光ラベラー分子を第一励起状態に励起させ、続いて即座に波長 λ_2 の光により高位な量子状態に励起させることで、第二励起状態からの蛍光を抑制して、空間的な蛍光領域の人為的な抑制を行い、空間分解能の向上を図る。

【0011】このような分子の光学的な性質は量子化学的な立場から以下のように説明することができる。一般に、分子は、それを構成する各原子が σ または π 結合によって結ばれている。言い換えると、量子化学によれば、分子の分子軌道は σ 分子軌道または π 分子軌道を持っていて、これらの分子軌道に存在する電子が各原子を結合する重要な役割を担っている。そのうちでも、 σ 分子軌道の電子は、各原子を強く結合し、分子の骨格である分子内の原子間距離を決める。それに対して、 π 分子軌道の電子は、各原子の結合にほとんど寄与しないで、むしろ分子全体に極めて弱い力で束縛される。

【0012】多くの場合、 σ 分子軌道にいる電子を光で励起すると、分子の原子間隔が大きく変化し、分子の解離を含む大きな構造変化が起きる。その結果として、原子の運動エネルギーや構造変化するために光が分子に与えたエネルギーのほとんどが、熱エネルギーに形を変える。したがって、励起エネルギーは蛍光という光の形態で消費されない。また、分子の構造変化は極めて高速で消費されない。たとえばピコ秒より短い、起こるので、その過程で仮に蛍光が起きても極めて蛍光寿命が短い。しかし、それに対し、 π 分子軌道の電子が励起しても分子の構造自体はほとんど変化せず、高位の量子的な離散準位に長時間とどまり、ナノ秒オーダーで蛍光を放出して脱励起する性質を持つ。

【0013】量子化学によれば、分子が π 分子軌道を持つことと、二重結合を持つことは同等であり、用いる

BEST AVAILABLE COPY

(7) 001-100102 (P2001-100102A)

蛍光ラベラー分子には、二重結合を豊富に持つ分子を選定することが必要条件となる。そして、二重結合を持つ分子でもベンゼンやピラジンなどの6員環分子においては、第二励起状態からの蛍光が極めて弱いことが確かめられている(たとえば、M.Fujii et.al. Chem.Phys.Lett. 171(1990)341)。したがって、ベンゼンやピラジンなどの6員環を含む分子を蛍光ラベラー分子として選定すれば、第一励起状態からの蛍光寿命が長く、しかも光励起により第一励起状態から第二励起状態に励起させることで分子から蛍光を容易に抑制できるので、顕微鏡の超解像性を効果的に利用することができる。

【0014】すなわち、これら蛍光ラベラー分子により試料を染色して観察を行えば、高空間分解能で試料の蛍光像を観察することができるだけでなく、その蛍光ラベラー分子の側鎖の化学基を調整することにより生体試料の特定の化学基のみを選択的に染色でき、よって、詳細な試料の化学組成までも分析可能となる。一般に、二重共鳴吸収過程は、二つの光波長や偏光状態等が特定の条件を満たすときにのみ起こるので、これを用いることで非常に詳細な分子の構造を知ることができる。すなわち、光の偏光面と分子の配向方向とは強い相関関係があり、二つの波長の光のそれぞれの偏光面と分子の配向方向とが特定の角度を成すときに、二重共鳴吸収過程が強く起こる。したがって、二つの波長の光を試料面に同時照射して、それぞれの偏光面を回転させることにより、蛍光の消失の程度が変化するようになるので、その様子から観測しようとする組織の空間配向の情報も得られる。さらに、二つの波長の光を調整させることでこのことが可能である。

【0015】以上説明したように、二重共鳴吸収過程を用いた従来の光学顕微鏡では、超解像性ととともに、高い分析能力も有していることがわかる。また、この二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡において、蛍光抑制をより効果的に起こすことができる蛍光ラベラー分子や適正な光の照射タイミングについても提案されている。

【0016】図7は、波長 λ_1 と波長 λ_2 の二種類の光を試料に照射するタイミングを例示したものである。この図7に例示したように、蛍光ラベラー分子が蛍光を発する時間、すなわち第一励起状態の寿命 τ より短いパルス光を用い、まず時間 t だけ波長 λ_1 の光を照射し、引き続き波長 λ_2 の光を照射している。定性的に述べると、まず、蛍光ラベラー分子の第一励起状態の寿命より十分短い波長 λ_1 のパルス光を時間 t の間照射し、観察領域に第一励起状態の分子を生成させる。その直後に、観察に必要としない領域に同じく第一励起状態の寿命より十分短い波長 λ_2 のパルス光を照射し、第一励起状態にある分子を第二励起状態に励起させて、蛍光を抑制する。

【0017】この過程は、さらに以下のように定量的に説明できる。一般に、基底状態の分子を波長 λ_1 の光で

第一励起状態に励起する場合、その励起過程は下記のレート方程式により記述できる。すなわち、試料に染色した分子の単位体積当たりの分子数を N_0 とし、波長 λ_1 の光のフォトンフラックスを I_0 、波長 λ_1 の光照射よりの時間 t 後の基底状態の分子数を N とする。そして、第一励起状態の寿命を τ とし、波長 λ_1 の光により基底状態から第一励起状態に遷移する時の吸収断面積を σ_{01} とすると、レート方程式は次式のようになる。

【0018】

【数1】

$$\frac{dN}{dt} = N_0 I_0 \sigma_{01} \frac{(N_0 - N)}{\tau}$$

【0019】この式を具体的に解けば、光照射より時間 t 後の単位体積当たりの第一励起状態の分子数 n を求めることができる。つまり、

【0020】

【数2】

$$n = \frac{N_0 I_0 \sigma_{01} \tau}{(1 + I_0 \sigma_{01} \tau)} \left[1 - e^{-\left\{ \left(I_0 \sigma_{01} + \frac{1}{\tau} \right) t \right\}} \right]$$

$$\text{但し、} n = N_0 - N$$

【0021】となる。この数2によれば、下記の数3の条件を満たすように強くない光量で波長 λ_1 の光を照射することにより、数2は数4とすることができる。

【0022】

【数3】

$$\left(I_0 \sigma_{01} + \frac{1}{\tau} \right) t \approx 0$$

【0023】

【数4】

$$n \approx I_0 \sigma_{01} N_0 t$$

【0024】すなわち、数3によれば、波長 λ_1 の光の照射時間を分子の第一励起状態の寿命より短くし、しかも、波長 λ_1 の光のフォトンフラックスが小さいときは、 n は照射時間 t にほぼ比例する。次に、波長 λ_1 の光の照射が終了し、その直後に波長 λ_2 の光を時間 T 照射したときの第一励起状態にある分子を第二励起状態に励起する場合を考える。

【0025】波長 λ_2 の光のフォトンフラックスを I_1 、波長 λ_1 の光照射より時間 $T+t$ 後の第一励起状態の分子数を n とし、そして、波長 λ_2 の光により第一励起状態から第二励起状態に遷移するときの吸収断面積を σ_{12} とすると、 n に関するレート方程式は、次式のようになる。

【0026】

BEST AVAILABLE COPY

!(8) 001-100102 (P2001-100102A)

【数5】

$$\frac{dn}{dt} = -\sigma_{12} I_1 n - \frac{n}{\tau}$$

【0027】この式を解くことで、波長 λ_1 の光を時間 t だけ照射し、波長 λ_1 の光の照射を止め、その直後に波長 λ_2 の光を時間 T の間照射した場合の、 n は、次式のよに具体的に求められる。

【0028】

【数6】

$$n = (I_0 \sigma_{01} N_0 t) \cdot e^{-\left(\sigma_{12} I_1 t + \frac{1}{\tau}\right) T}$$

【0029】一方、この数6によれば、波長 λ_2 の光の照射を全く行わない場合は、 $I_1 = 0$ とにおいて、

【0030】

【数7】

$$n = (I_0 \sigma_{01} N_0 t) \cdot e^{-\frac{T}{\tau}}$$

【0031】となる。実は、数6は、蛍光を抑制された領域における単位体積あたりの第一励起状態の分子数を示し、数7は、蛍光を抑制されない領域における単位体積あたりの第一励起状態の分子数を示している。分子の蛍光収率を Φ とすると、蛍光を抑制され領域からの蛍光強度 F_1 と、蛍光を抑制されない領域からの蛍光強度 F_2 とは、それぞれ、以下の数8および数9で与えられる。

【0032】

【数8】

$$F_1 = \Phi(I_0 \sigma_{01} N_0 t) \cdot e^{-\left(\sigma_{12} I_1 t + \frac{1}{\tau}\right) T}$$

【0033】

【数9】

$$F_2 = \Phi(I_0 \sigma_{01} N_0 t) \cdot e^{-\frac{T}{\tau}}$$

【0034】蛍光抑制比率(= F_1 / F_2)は、数8および数9より求めると、数10となる。

【0035】

【数10】

$$\frac{F_1}{F_2} = e^{-\sigma_{12} I_1 T}$$

【0036】したがって、図7に例示したタイミングで λ_1 と λ_2 の二種類の光を照射すれば、数10の比率で観察に必要としない領域からの蛍光を抑制できる。数10によれば、 $T < \tau$ の条件で I_1 と T を調整することにより、任意の比率で蛍光を抑制できる。図8は、観察領域から発光する蛍光の強度を測定するタイミングを例示

したものである。蛍光強度を測定するタイミングは、基本的には、波長 λ_2 の光の照射が終了した後に、観察領域から発光する蛍光の強度を十分に時間をかけて測定することになる。このような測定タイミングによって、抑制された領域からの蛍光がほとんどない状態で、非常に S/N 良く観察領域からの蛍光を計測できる。

【0037】図9および図10は、それぞれ、波長 λ_1 と波長 λ_2 の二種類の光の試料への照射タイミングと観察領域からの蛍光強度の測定タイミングとの一例を示したものである。これら図9および図10に例示した各タイミングによっても、効果的に超解像顕微鏡を実現することができる。しかし、これら図8～図10のタイミングのいずれの場合も、 t および T は τ より短い($t, T < \tau$)必要がある。それは、逆に $t, T > \tau$ であると、 λ_1 と λ_2 の二種類の光を照射中に第一励起状態の分子が基底状態に脱励起してしまい、観察領域からの蛍光自体が無くなってしまいうためである。仮に、 $t, T < \tau$ の場合に対応するために、図11に例示したように、 λ_1 と λ_2 の二種類の光を同時に照射して、同時に観察領域から発光する蛍光の強度を測定することも可能であるが、その場合には、蛍光測定時に λ_1 と λ_2 の二種類の強い励起光が検出器に混入してしまう可能性がある。

【0038】したがって、 $t, T < \tau$ の条件のもとで、図8～図10に例示したようなタイミングで λ_1 と λ_2 の二種類の光を試料に照射するのが望ましいとされている。また、多少、 S/N は劣化するが、 λ_1 光と λ_2 光を全く同じタイミングで照射することもできる。また、上述のような条件およびタイミングで λ_1 と λ_2 の二種類の光を試料に照射する場合では、照射終了直後から、観察領域より発光する蛍光を検出器で計測する必要があり、その際には、汎用市販のロジック回路によりゲート信号を作成し、検出器からの出力電気信号をパーソナルコンピュータのメモリに取り込む作業がある。基本的には、図7～図10のタイムチャートに示したように、染色する分子の蛍光寿命が光源のパルス幅より長いことで効果が大きくなる。しかし、現在の汎用市販のロジック回路では、そのスイッチング速度が1 nsec程度であるために、 τ 自体が1 nsec以上であることが望まれる。すなわち、蛍光寿命が1 nsec以上でないと、検出器および計測回路がアクティブになる前に、観察領域からの蛍光現象が終了して、計測することができなくなってしまう。このように、試料を染色する蛍光ラベラー分子は1 nsec以上の蛍光寿命を持つことが必要となる。

【0039】一方、信号を取り出す有効蛍光領域に若目すると、確かに蛍光抑制領域では蛍光強度が弱い方が望ましいが、 S/N 比の向上という観点からは、有効蛍光領域の発光強度が強い方が望まれている。すなわち、 λ_1 の光で励起された直後の第一励起状態の分子数が十分にある時刻からの蛍光強度を測定する。上記の数9によ

BEST AVAILABLE COPY

(9) 001-100102 (P2001-100102A)

れば、励起分子の数は、その励起寿命で決まる時定数により指数関数的に減衰する。ところで、指数関数の性質として、光のパルス幅もおよびTが第一励起状態の分子寿命 τ よりも十分に短ければ、 $\lambda 1$ の光で励起された直後の第一励起状態の分子から十分強い強度の蛍光、すなわち有効信号強度を測定できる。特に、 τ およびTが第一励起状態の分子寿命 τ の10分の1程度であれば、第一励起状態の分子数は $\lambda 1$ の光で励起された直後の分子数の90%もあり、有効蛍光領域からの十分な信号強度が得られる。

【0040】

【発明が解決しようとする課題】上述した通りの従来の光学顕微鏡は、その超解像性と分析能力において、際立った有用性と技術的優位性を有している。しかしながら、これら従来の光学顕微鏡では、第一励起状態から第二励起状態へ励起させて、第一励起状態からの蛍光を抑制するための十分な強度を有する波長 $\lambda 2$ 光（以下、この光をイレース光と呼び、また、基底状態から第一励起状態へ励起させる波長 $\lambda 1$ の光をポンプ光と呼ぶこととする）が必要であり、このイレース光は、現在実用化されている非共鳴二光子吸収過程を用いたレーザー走査型の蛍光顕微鏡における数 TW/cm^2 という高強度レーザー光よりも僅かに少ない強度ではあるものの、非常に強力なものであるため、生体試料への影響が問題となっていた。

【0041】このような高強度レーザーは、試料の生体細胞にとっては強すぎる光であり、特に、長時間の測定を要する場合には、サンプルの蓄熱や多光子吸収等の影響が著しく、このような影響を極力低減する必要がある。また、ポンプ光およびイレース光の波長が、生体細胞のもつ吸収波長帯域から外れていることも必要である。

【0042】さらにまた、理論上通りの解像度を表現するためには、試料面上に集光したイレース光のビームが、中央部がゼロである強度分布を有し、且つ軸対称である形状を有するビームである必要がある（このようなビームを、以下、中空ビームと呼ぶこととする）。これは、強度分布の乱れがそのまま顕微鏡の解像度の劣化につながるためである。

【0043】イレース光の光源としてはレーザーを用いる場合が多いが、上記のような理論通りの形状のビームとするには、その大前提として、レーザーのビームプロファイルが良くななくてはならない。すなわち、ビームの強度分布が光軸軸対称であることが望ましい。たとえば、従来より光源として用いられる色素レーザーは、そのビーム形状が三角形に近く、その強度分布も一様でない。したがって、試料面で集光したビーム形状が、期待する中空ビームではなく、崩れたビームパターンとなるため、顕微鏡画像の解像度の劣化や画質低下が生じてしまう。加えて、微小な輪帯アーチャーを設け、その縮小像を中空ビームとして用いることも提案されている

が、このような輪帯アーチャーを利用すると、光軸合わせや、焦点合わせ等が難しく、良好な画像を得るまでの調整時間が非常に長くなり、且つそのための熟達技能も必要となる。

【0044】したがって、超解像顕微鏡の機能を十分に引出すためには、これらの問題点を解決する光学技術が必要とされている。また、実用面から考えると、操作性のよさも重要な要素である。従来の顕微鏡技術は、色素レーザーやオプティカルパラメトリックオシレータ（OPO）によって、蛍光ラベラー分子のポンプ光やイレース光の共鳴波長に光源の光を同調させることで、多くの蛍光ラベラー分子に対して適用可能である。

【0045】しかしながら、色素レーザーにおいては色素の劣化による光量の低下、および頻繁な色素交換が伴うといった問題がある。OPOは、便利ではあるが、非常に高価である。さらに、非常に精密な光学システムであり、湿度や温度の管理が厳しく、しかも使用する非線形光学結晶の寿命が短く、そして、これは高価であるので、ユーザにとっては保守管理の負担の大きい光源である。

【0046】したがって、使用する光源は、波長固定であって、その構成が簡単で廉価であることが好ましい。ところで、近年では、顕微鏡観察においてレーザー光を用いることにより微小粒子を捕獲および移動することのできるマイクロマニピュレータ技術が開発されており、超解像顕微鏡にもその機能を付加し、操作性と機能性の高い顕微鏡システムの実現が強く望まれている。

【0047】このマイクロマニピュレータ技術は、たとえばポリエチレン粒子の誘電体粒子に高強度のレーザー光を集光させることにより、分極を生じさせて、その粒子を電場が一番強い領域に引きつけることにより、捕獲および移動を行うものである。また、この技術においては、限られた特定の粒子を安定的に捕獲し、できるだけ色々な方向からレーザー光を粒子に当てることが良いことが知られている。

【0048】しかしながら、様々な方向からのレーザー光照射のためには、多数のレーザー光源や複雑なミラー光学系が必要となるので、一空間に捕獲することは可能であっても、移動操作が極めて困難なものとなっていた。また、 $100\text{MW}/\text{cm}^2$ 以上の強いレーザー集光した。また、一方向から照射することにより、特定粒子を一空間にトラップさせ、ビーム走査により空間移動させることは可能であるものの、試料が高強度のレーザー光を浴び続けることになるので、試料へのダメージが深刻なものとなっていた。その結果として、生体細胞が感光死したり、分子自身の解離または光化学反応による化学変化が引き起こされるといった問題があった。

【0049】この出願の発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態へ励起させるイレース光を、簡単にコン

BEST AVAILABLE COPY

(電0)01-100102 (P2001-100102A)

パクトな光学系を用いて、優れたビームプロファイルで集光させることができ、安定性および操作性が高く、優れた超解像性を有する、新しい顕微鏡システムを提供することを目的としている。また、試料へダメージを与えることなく、中空ビームであるイレース光を用いて試料粒子の捕獲および移動を行うことのできる、マイクロマニピュレータ機能を有する、新しい顕微鏡システムも提供する。

【0050】

【課題を解決するための手段】この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、調整された試料と顕微鏡本体とを備えた顕微鏡システムであって、調整された試料は、少なくとも基底状態を含め3つの電子状態を有し、その第一電子励起状態から第二電子励起状態への励起波長帯域が、第一電子励起状態から基底状態の振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光波長帯域と重複している分子により染色されたものであり、顕微鏡本体は、分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させる波長入1光の光源と、第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態またはより高い電子励起状態へ励起させる波長入2光の光源と、波長入1光と波長入2光とを調整された試料上に集光させる集光光学系と、調整された試料上における波長入1光の照射領域および波長入2光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段と、励起された分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する発光検出器とを備え、重ね手段を介して波長入1光と波長入2光とを照射することにより、分子が第一電子励起状態から基底状態へ脱励起する際の発光の領域を抑制するものであることを特徴とする光学顕微鏡システム（請求項1）、調整された試料と顕微鏡本体とを備えた顕微鏡システムであって、調整された試料は、少なくとも基底状態を含め3つの電子状態を有する分子により染色されたものであり、顕微鏡本体は、分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させる波長入1光の光源と、第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態またはより高い電子励起状態へ励起させる波長入2光の光源と、波長入1光と波長入2光とを調整された試料上に集光させる集光光学系と、調整された試料上における波長入1光の照射領域および波長入2光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段と、励起された分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する発光検出器とを備え、重ね手段を介して波長入1光と波長入2光とを照射することにより、分子が第一電子励起状態から基底状態へ脱励起する際の発光の領域を抑制するものであり、波長入2光を集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内で、光軸に関する対称位置において π だけ位相がずれた位相分布を有していることを特徴とする顕微鏡システム（請求項2）、および調整された試料と顕微鏡本体とを備えた顕微鏡システムであって、調整された試料は、少なくとも基底状態を含め3つの電子状態を有し、その第一電子励

起状態から第二電子励起状態への励起波長帯域が、第一電子励起状態から基底状態の振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光波長帯域に重複している分子により染色されたものであり、顕微鏡本体は、分子を基底状態から第一電子励起状態へ励起させる波長入1光の光源と、第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態またはより高い電子励起状態へ励起させる波長入2光の光源と、波長入1光と波長入2光とを調整された試料上に集光させる集光光学系と、調整された試料上における波長入1光の照射領域および波長入2光の照射領域を一部分重ね合わせる重ね手段と、励起された分子が基底状態へ脱励起する際の発光を検出する発光検出器とを備え、重ね手段を介して波長入1光と波長入2光とを照射することにより、分子が第一電子励起状態から基底状態へ脱励起する際の発光の領域を抑制するものであり、波長入2光を集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内で、光軸に関する対称位置において π だけ位相がずれた位相分布を有していることを特徴とする顕微鏡システム（請求項3）を提供する。

【0051】また、この出願の発明は、上記の顕微鏡システムにおいて、第一電子励起状態から第二電子励起状態への励起波長帯域と基底状態から第一電子励起状態への励起波長帯域とが異なること（請求項4）、分子が、六員環を一つまたは複数含む分子であること（請求項5）、六員環が、ベンゼン環またはプリン塩基であること（請求項6）、分子が、六員環誘導体の一つまたは複数含む分子であること（請求項7）、六員環誘導体が、ベンゼン誘導体またはプリン誘導体であること（請求項8）、分子が、キサンチン系分子、ローグミン系分子、オキサンジン系分子、シアニン系分子、クマリン系分子、オキサゾール系分子、オキサジアゾール系分子、スチルベン系分子のいずれかであること（請求項9）、分子が、2,2'-Dimethyl-p-terphenyl: P-terphenyl (PT P): 3,3',2'',3'''-Tetramethyl-P-quaterphenyl: 2,2'''-Dimethyl-P-quaterphenyl: 2-Methyl-5-t-butyl-p-quaterphenyl: 2-(4-Biphenyl)-5-(4-t-butylphenyl)-1,3,4-oxiazol (BPBD-365): 2-(4-Biphenyl)-phenyl-1,3,4-oxadiazol: 2,5,2''',5''''-Tetramethyl-p-quinquephenyl: 3,5,3''',5''''-Tetra-t-butyl-p-quinquephenyl: 2,5-Diphenyloxazol: 2,5-Diphenylfuran: PQP (p-Quaterphenyl): 2,5-Bis-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol: p-Quaterphenyl-4,4'''-disulfonic acid Disodium salt: p-Quaterphenyl-4,4'''-disulfonic acid Dipotassium salt: 4,4'''-Bis-(2-butyloctyloxy)-p-quaterphenyl: 3,5,3''',5''''-Tetra-butyl-p-sexiphenyl: 2-(1-Naphthyl)-5-phenyloxazol: 2-(4-Biphenyl)-6-phenylbenzoxazotetrasulfonic acid Potassium Salt: 2-(4-Biphenyl)-6-phenylbenzoxazol-1,3,4,4'-Diphenylstilbene: (1,1'-Biphenyl)-4-sulfonic acid, 4,4''-1,2-ethene-diylbis-, dipotassium salt: 2,5-

BEST AVAILABLE COPY

(E1) 001-100102 (P2001-100102A)

Bis-(4-biphenyl)-oxazol: 2,2'-((1,1'-Biphenyl)-4,4'-diyl)-2,1-ethenediyl)-bis-benzenesulfonic acid Disodium Salt: 7-Amino-4-methylcarbostyryl: 1,4-Di(2-(5-phenyloxazolyl))benzene; 7-Hydroxy-4-methylcoumarin: p-Bis(o-methylstyryl)-benzene: Benzofuran, 2,2'-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl-bis-tetrakisulfonic acid: 7-Dimethylamino-4-methylquinolom-2: 7-Amino-4-methylcoumarin: 2-(p-Dimethylaminostyryl)-pyridylmethyl iodide: 7-Diethylaminocoumarin: 7-Diethylamino-4-methylcoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-8-methylquinolizino-(9,9a,1-gh)-coumarin: 7-Diethylamino-4-trifluormethylcoumarin: 7-Dimethylamino-4-trifluormethylcoumarin: 7-Amino-4-trifluormethylcoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydroquinolizino-(9,9a,1-gh)-coumarin: 7-Ethylamino-6-methyl-4-trifluormethylcoumarin: 7-Ethylamino-4-trifluormethylcoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-carboethoxyquinolizino-(9,9a,1-gh)coumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-9-(3-pyridyl)-quinolizino-(9,9a,1-gh)coumarin: 3-(2'-N-Methylbenzimidazolyl)-7-N,N-diethylaminocoumarin: 2,3,5,6,11H,4H-Tetrahydro-9-acetylquinolizino-(9,9a,1-gh)coumarin: N-Methyl-4-trifluormethylpiperidino-(3,2-g)-coumarin: 2-(p-Dimethylaminostyryl)-benzothiazolylethyl iodide: 3-(2'-Benzimidazolyl)-7-N,N-diethylaminocoumarin: Brillantsulfaflavon: 3-(2'-Benzothiazolyl)-7-diethylaminocoumarin: 2,3,5,6-1H,4H-Tetrahydro-8-trifluormethylquinolizino-(9,9a,1-gh)coumarin: 3,3'-Diethyloxacarbocyanine iodide: 3,3'-Dimethyl-9-ethylthiacarbocyanine iodide: Disodium Fluorescein(Uranin): 9-(o-Carboxyphenyl)-2,7-dichloro-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on-2,7-Dichlorofluorescein: Fluorescein 548: Fluorol 555(Fluorol 7GA): o-(6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)-benzoic acid(Rhodamine 560): Benzoic Acid, 2-(6-ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl, perchlorate(Rhodamine 575): Benzoic Acid, 2-(6-ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl, ethyl ester, monohydrochloride(Rhodamine 590): 1,3'-Diethyl-4,2'-quinolyloxacarbocyanine iodide: 1,1'-Diethyl-2,2'-carbocyanine Iodide: 2-(6-Diethylamino)-3-(ethylamino)-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid(Rhodamine 610): Ethanaminium, N-((6-diethylamino)-9-(2,4-disulfophenyl)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylhydroxid, inner salt, sodium salt: Malachit Green: 3,3'-Diethylthiacarbocyanine Iodide: 1,3'-Diethyl-4,2'-quinolythiacarbocyanine Iodide: 8-(2-Carboxyphenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a',1-hi]xanthylum Perchlorate(Rhodamine 640): 4-Dicyanomethylene-2-methyl-6-(p-dimethylaminostyryl)-4H-pyran: 3,3'-

Diethyloxadibocarbocyanine Iodide: 8-(2,4-Disulfophenyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a',1-hi]xanthene(Sulforhodamine 640): 5,9-Diaminobenzo(a)phenoxazonium Perchlorate: 9-Diethylamino-5H-benzo(a)phenoxazin-5-one: 5-Amino-9-diethylimino(a)phenoxazonium Perchlorate: 3-Ethylamino-7-ethylimino-2,8-dimethylphenoxazin-5-ium Perchlorate: 8-(Trifluoromethyl)-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a',1-hi]xanthylum Perchlorate: 1-Ethyl-2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: Carbazine 122: 9-Ethylamino-5-ethylimino-10-methyl-5H-benzo(a)phenoxazonium Perchlorate: 3-Diethylamino-7-diethyliminophenoxazonium Perchlorate: 3-Diethylthiacarbocyanine Iodide: Oxazine 750: 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanine Iodide: 1,1'-Diethyl-4,4'-carbocyanine Iodide: 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-1,3,3-trimethyl-3H-indolum Perchlorate: 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-3-ethylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1'-Diethyl-2,2'-dicarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(9-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo(i,j)-chinolizinium))-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: 3,3'-Dimethyloxatricarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-quinolinium Perchlorate: 8-Cyano-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a,1-bc:9',9a',1-hi]xanthylum Perchlorate(Rhodamine 800): 2-(6-(4-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindotricarbocyanine Iodide: IR125: 3,3'-Diethylthiatricarbocyanine Iodide: IR144: 2-(6-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H-benzo(i,j)-chinolizinium))-2,4-neopentylene-1,3,5-hexatrienyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 3,3'-Diethyl-9,11-neopentylmethiatricarbocyanine Iodide: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethyl-4,4',5,5'-dibenzo-2,2'-indotricarbocyanine Iodide: 3,3'-Diethyl-4,4',5,5'-dibenzothiatricarbocyanine Iodide: 1,2'-Diethyl-4,4'-dicarbocyanine Iodide: IR140: 2-(8-(4-p-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: IR132: 2-(8-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H,benzo(i,j)-chinolizinium))-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: IR26: IR5 のいずれかであること(請求項10)、波長λ1光を集光して得られるビームの光軸と波長λ2光を集光して得られるビームの光軸とが同軸であること(請求項11)、波長λ2光を集光

BEST AVAILABLE COPY

(電 2) 101-100102 (P2001-100102A)

して得られるビームが、その光軸と直交する面内において、光軸の周りを1回転したときに0から 2π まで連続的に変化する位相分布を有していること(請求項12)、波長 λ 2光を集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内において、該光軸の周りを1回転したときに0から 2π まで不連続的に変化する位相分布を有していること(請求項13)、波長 λ 2光を集光して得られるビームがベッセルビームであること(請求項14)、ベッセルビームが一次のベッセルビームであること(請求項15)、波長 λ 2光を集光して得られるビームが、ガウス型、ラグエル型またはエルミート型のいずれかの発振モードを持つレーザービームであること(請求項16)、波長 λ 1光の光源として、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかが備えられていること(請求項17)、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長が、波長 λ 1であること(請求項18)、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長の高調波が、波長 λ 1であること(請求項19)、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長とその高調波との和周波または差周波が、波長 λ 1であること(請求項20)、波長 λ 2光の光源として、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかが備えられていること(請求項21)、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長が、波長 λ 2であること(請求項22)、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長の高調波または差周波が、波長 λ 2であること(請求項23)、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーのいずれかの発振波長とその高調波との和周波または差周波が、波長 λ 2であること(請求項24)、気体レーザーが、エキシマレーザー、銅蒸気レーザー、アルゴンレーザー、He-Neレーザー、CO₂レーザー、He-Cdレーザーまたは窒素レーザーのいずれかであること(請求項25)、気体レーザーが、モードロック型であること(請求項26)、固体レーザーが、Nd:YAGレーザー、Tiサファイヤレーザー、YLFレーザーまたはルビーレーザーのいずれかであること(請求項27)固体レーザーが半導体レーザー励起型であること(請求項28)、固体レーザーがモードロック型であること(請求項29)、顕微鏡本体が、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーからのレーザー光の波長変換を行うための非線形媒質または波長変調素子をつまは板数有していること(請求項30)、非線形媒質または波長変調素子が非線形結晶であること(請求項31)、非線形媒質または波長変調素子がラマンシフターであること(請求項32)、波長 λ 1光が、気体レーザーまたは固定レーザーの基本波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものであること(請求項33)、波長 λ 1

光が、気体レーザーまたは固定レーザーの高調波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものであること(請求項34)、波長 λ 2光が、気体レーザーまたは固体レーザーの基本波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものであること(請求項35)、波長 λ 2光が、気体レーザーまたは固体レーザーの高調波を非線形媒質または波長変調素子で波長変調したものであること(請求項36)、波長 λ 2光の集光光学系が、波長 λ 2光を集光して得られるビームにその光軸に対して直交する平面内で位相差分布を与える屈折率分布または光路差分布を有する位相板を備えていること(請求項37)、波長 λ 2光の集光光学系が輪帯光学系を備えていること(請求項38)、波長 λ 2光の集光光学系が回折光学系を備えていること(請求項39)、波長 λ 2光の集光光学系がアキシコンを備えていること(請求項40)、気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーの共振器内に、リング状の輪帯ミラー、輪帯回折格子、フレネルゾーンプレート、輪帯アパーチャー、または光軸と直交する面内の電場に関して軸対称にある電場の互いに π だけずれた位相差を与える位相板のいずれかが、少なくとも一つ備えられていること(請求項41)、顕微鏡本体が、分子からの発光を発光検出器に集光する発光集光光学系を有していること(請求項42)、発光集光光学系がシャープカットフィルタを備えていること(請求項43)、発光集光光学系がノッチフィルターを備えていること(請求項44)、発光集光光学系がバンドパスフィルターを備えていること(請求項45)、バンドパスフィルターが、波長 λ 1光および波長 λ 2光を透過させず、分子からの発光を透過させるものであること(請求項46)、調整された試料が、波長 λ 1光および波長 λ 2光が透過する物質からなる封入手段により封入されていること(請求項47)、調整された試料が、波長 λ 1光および波長 λ 2光が透過する物質からなるカバー手段によりカバーされていること(請求項48)、前記物質が、合成石英SiO₂、CaF₂、NaF、Na₃AlF₆、LiF、MgF₂、SiO₂、LaF₃、NdF₃、Al₂O₃、CeF₃、PbF₂、MgO、TbO₂、SnO₂、La₂O₃、またはSiOであること(請求項49)、顕微鏡本体は、波長 λ 1光と波長 λ 2光の光源とは別に、連続発振レーザーを備えており、この連続発振レーザーを調整された試料上に集光して得られるビームが、その光軸と直交する面内で、光軸に関する対称位置において π だけ位相がずれる位相分布を有していること(請求項50)、顕微鏡本体は、連続発振レーザーを調整された試料上に集光して得られるビームを、波長 λ 1光を集光して得られるビームおよび波長 λ 2光を集光して得られるビームとは独立して、調整された試料上を相対的に走査するための手段を有していること(請求項51)などもその態様として提供する。

BEST AVAILABLE COPY

(電 3) 101-100102 (P2001-100102A)

【0052】

【発明の実施の形態】この出願の発明の顕微鏡システムにおいては、調整された試料が、少なくとも基底状態を含め三つの電子状態を有し、その第一電子励起状態から第二電子励起状態への励起波長帯域が、第一電子励起状態から基底状態の振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光波長帯域と重複している分子により染色されたものである。

【0053】ここで、この分子、いわゆる蛍光ラベラー分子について、その高い電子励起状態からの脱励起過程を考察することにより、詳しく説明する。図12は、分子の脱励起過程を概念的に例示したものである。一般に、分子が基底状態であるS0から最低(=第一)励起状態であるS1に励起すると、 π 電子を持つ分子は多いものでは数10%の取率で蛍光を発して、S0に脱励起をする。これが蛍光過程である。それ以外は、振動緩和、つまり内部転換により、直接、S0に無放射失活するが、一部はスピン多重度が異なる寿命が極めて長い状態であるT1に至り、つまり系間交差をして、さらにそのT1から蛍光を発してS0に戻る。通常の蛍光顕微鏡では、蛍光収率の高い分子で試料を染色し、光照射でこの分子をS1に励起させ、そのS1からの蛍光を観察して映像化する。

【0054】また、S1よりさらに高い第二励起状態であるS2に分子が励起すると、図1にも例示したように非常に複雑な緩和過程により基底状態S0に脱励起する。すなわち、たとえば、一部のS2の励起分子は内部転換や系間交差によりS0またはT1状態に脱励起する。また、その他の励起分子はS1の高い振動準位に内部転換した後、S1の最も低い振動準位に至る。その後、上述したS1からの緩和過程を経て、S0に戻る。

【0055】ここで、注目すべきことは、S2より高位の励起状態からの蛍光発光収率が極めて低いことである。これは、S2の分子の多くが直接S0の無放射失活したり、S1に内部転換した後、かなりの割合でS0に無放射失活するためである。また、T1に至った分子も蛍光過程に寄与しないので、結局S1に至った一部の分子のみが蛍光を発する。これはKraushの法則と呼ばれるものである。特に、気相のベンゼン誘導体分子ではS2からの蛍光がほとんど観測されない。

【0056】一般に、二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡は、上記のようにS2以上の高位の電子励起状態からの分子の蛍光収率が極めて低いことを利用している。ところで、一部の分子は、図13のエネルギーダイヤグラムに例示したように、S1からSn(nは2以上である)に遷移するときの波長帯域が、S1からS0の振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光発光波長帯域と重複している構造を持つ。このような電子構造をもつ分子では、実質的にイレース光による蛍光抑制効果が強まる現象が起こる。

【0057】すなわち、波長 λ_1 のポンプ光でS0の分子をS1に励起し、共鳴波長 λ_2 のイレース光を照射すると、S1の分子は、Snに遷移すると同時に、かなりのものが誘導放出によってS0の高位の振動準位に脱励起する。この時、Snに励起した分子は蛍光が抑制される。一方、誘導放出した分子については、イレース光と同じ波長の光が発光するので、イレース光と同じ波長の光の強度は若干増加し、イレース光以外の波長で光る蛍光強度は減る。したがって、イレース光以外の波長で光る蛍光発光をモニターしているかぎり、実質的に優れた蛍光抑制を行うことができる。

【0058】このようにS1からSnに遷移するときの波長帯域がS1からの蛍光発光波長帯域と重複している分子を、この出願の発明の顕微鏡システムにおける試料を染色する分子とすることにより、上述した誘導放出が寄与する蛍光抑制効果が加わるので、顕微鏡本体の超解像性をさらに向上させることができる。また、それと同時に、イレース光の強度が低くても蛍光抑制を容易に起こすことができ、観察試料のダメージを減少させることができる。

【0059】上述したような光学的特性を有する分子としては、たとえば、キサンチン系に属するローダミン(Rhodamine)系の分子がある。図14は、ローダミン系の分子の一つであるRhodamine6Gの分子構造式、およびその光学特性としての各断面積と波長との関係を例示したものである(E.Sahar&D.Treves:IEEE J.Quantum Electron., QE-13,962(1977))。この図14において、 σ はS0からS1への吸収断面積、 σ_s はS1からS0への誘導放出断面積、 σ_a はS1からSnへの吸収断面積、 σ_T はT1からTnへの吸収断面積を表している。

【0060】この図14に例示したように、S0からS1への共鳴波長は約530nmの前後に広がっている(σ 参照)が、S1からSnへの共鳴波長は約500~600nmの前後に広がっている(σ_a 参照)。そして、S1からSnへの共鳴波長領域と重複して、約530~650nmの領域に蛍光発光帯域が広がっている(σ_s 参照)。さらに、約530~600nmには特別な波長帯域が存在することがわかる。すなわち、この波長帯域の光では、分子をS0からS1へ励起させることはできないが、S1からSnへの二重共鳴吸収過程と誘導放出が可能となる。

【0061】一般に、このRhodamine6Gを初め、ローダミン系の分子は、S1からSnに遷移するときの波長が、S1からS0の振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光波長帯域と重複している。また、クマリン系の分子もS1からSnに遷移するときの波長帯域がS1からの蛍光発光波長帯域と重複している。たとえば、クマリン系分子であるCoumarin500は、S0からS1への共鳴波長が260nmの前後、S1からSnへの共鳴波

BEST AVAILABLE COPY

PAGE 35/58 * RCVD AT 5/23/2005 4:31:15 PM [Eastern Daylight Time] * SVR:USPTO-EFXRF-1/13 * DNIS:8729306 * CSID:+1 212 319 5101 * DURATION (mm-ss):25-18

(註5) 01-100102 (P2001-100102A)

yl)-1,3,3-trimethyl-3H-indolium Perchlorate: 2-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-3-ethylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1'-Diethyl-2,2'-dicarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(9-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo(i,j)-chinolinozinium))-1,3-butadienyl)-pyridinium Perchlorate: 3,3'-Dimethyloxatricarbocyanine Iodide: 1-Ethyl-4-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-1,3-butadienyl)-quinolinium Perchlorate: 8-Cyano-2,3,5,6,11,12,14,15-octahydro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino[9,9a1-bc:9a',1-hi]xanthylum Perchlorate(Rhodamine 800): 2-(6-(4-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindotricarbocyanine Iodide: IR125: 3,3'-Diethylthiatricarbocyanine Iodide: IR144: 2-(6-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H-benzo(i,j)-chinolinozinium))-2,4-neopentylene-1,3,5-hexatrienyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: 3,3'-Diethyl-9,11-neopentylene-thiatricarbocyanine Iodide: 1,1',3,3,3',3'-Hexamethyl-4,4',5,5'-dibenz-2,2'-indotricarbocyanine Iodide-3,3'-Diethyl-4,4',5,5'-dibenzothiatricarbocyanine Iodide: IR140: 2-(8-(4-(p-Dimethylaminophenyl)-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: IR132: 2-(8-(9-(2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H,benzo(i,j)-chinolinozinium))-2,4-neopentylene-1,3,5,7-octatetraenyl)-3-methylbenzothiazolium Perchlorate: IR26: IR5.

【0064】以上の分子のなかで、たとえばクマリン系分子である7-Ethylamino-4-trifluoromethylcoumarin($C_{14}H_{10}NO_2F_3$: Coumarin500)では、S0からS1への励起波長帯域が266 nm前後、S1からS2への励起波長帯域が532 nm付近、蛍光波長帯域が532 nmとなっている。これらの266 nmおよび532 nmは、それぞれ、YAGレーザーの四倍波および二倍波に対応しているので、その基本波や高調波を、波長変換可能な非線形媒質または波長変調素子としてのBBO結晶やKTP結晶などの非線形結晶により波長変調することで容易に生成することができる。

【0065】よって、この発明の顕微鏡システムにおいて、たとえば、試料染色分子がクマリン系分子であり、顕微鏡本体におけるポンプ光の光源およびイレーズ光の光源としてYAGレーザーを用いることで、優れた超解像性が得られるだけでなく、色素レーザーを用いた従来の顕微鏡と比べて、優れた作業性および光学性能を有することができる。

【0066】すなわち、使用する波長を、基本的に非線形結晶の角度を初期設定するだけで決定することができるため、煩雑な波長調整作業をせずに、所望の励起波長の発生を容易に行うことができ、また、色素の劣化によ

るレーザーパワーの変動や低下が無く、発振効率も良いので、高出力なレーザーを用いる必要がなく、光源を小型で廉価なものとすることができるとともに、生体試料へのダメージをさらに低減させることができる。

【0067】YAGレーザーのビームプロファイルに関しては、位相面がそろった良好なガウシアンビームの発振技術が確立しているので、光軸対称で良質な中空ビーム型のイレーズ光を生成することができる。このようなYAGレーザーとしては、たとえば、市販されているパルス幅20 psec以下で、繰り返し周波数100 MHzのモードロックYAGレーザーを用いることができる。

【0068】また、染色分子がキサンチン系またはローダミン系の分子である場合でも、同様にYAGレーザーと非線形結晶を用いてポンプ光およびイレーズ光を発生させることができる。たとえば、Rhodamine6Gでは、前述のようにS0からS1への共鳴波長は530 nmの前後に広がって、S1からSnへの共鳴波長は500~600 nmの前後に広がっている。530 nm前後のポンプ光は、YAGレーザーの二倍波で対応できる。500~600 nm前後のイレーズ光は、非線形結晶のラマン効果を用いて(いわゆるラマンシフト)簡単に発生できる。たとえばYAGレーザーの二倍波の532 nmの光をラマンシフトに通すことにより、変換効率20%程度で約長波長側に30 nm程度シフトした560 nm前後のレーザー光を生成することができる。

【0069】また、非線形結晶を用いて生成されるYAGレーザーの基本波と高調波との和周波あるいは差周波を有するレーザー光を、ポンプ光またはイレーズ光とすることもできる。もちろん、YAGレーザー以外にも、上記した各分子に合わせて、波長固定の気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーや、各種非線形媒質または波長変調素子を用いることができる。

【0070】たとえば、気体レーザーとしては、エキシマレーザー、銅蒸気レーザー、アルゴンレーザー、He-Neレーザー、CO₂レーザー、He-Cdレーザー、窒素レーザーなどを用いることができ、また、固体レーザーとしては、Nd:YAGレーザー、Ti:サファイアレーザー、YLFレーザー、ルビーレーザーなどを用いることができる。

【0071】これらの各レーザーのなかでも、モードロック型のレーザーは、繰り返し周波数が高く、パルス振幅が数10 psec以下であり、この発明の顕微鏡システムにける超解像の顕微鏡本体により適した光源である。近年では、小型で、高輝度、短パルス、高繰り返し、半導体レーザー励起で、且つモードロック型の固体レーザーも、廉価でメンテナンスフリーとして実現されており、この固体レーザーは、超解像の顕微鏡本体の機能を十分に活かす条件を全て有している。

【0072】上述したような各気体レーザー、固定レーザーまたは半導体レーザーを波長λ1ポンプ光の光源お

BEST AVAILABLE COPY

(図6) 101-100102 (P2001-100102A)

よび波長 λ 2光の光源として用いて、その発振波長や高調波、あるいは発振波長と高調波との和周波または差周波を波長 λ 1および波長 λ 2にして、ポンプ光およびイレース光を発生させる。また、これら各種光源の基本波や高調波を非線形結晶などの各種非線形媒質または波長変調素子によって波長変調して、波長 λ 1ポンプ光および波長 λ 2イレース光を発生させることもできる。

【0073】ところで、蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡が理論通りの解像度を有するようになるには、前述したように、波長 λ 2光であるイレース光を試料面上に集光して得られるビームを、中央部の光強度がゼロとなる形状とし、照射領域の中央部に蛍光領域を残すように

する必要がある。この発明では、イレース光を集光して得られるビームを、中央部の光強度がゼロとなる形状とするため、光軸と直交する面内で、光軸に関する対象位置において π だけ位相がずれる位相分布を有するものとしている。

【0074】このような位相分布を有するビームとしては、ベッセルビームが適している。たとえば、図15に例示したような座標系を仮定すると、ベッセルビームは次式のような形で表すことができる。

【0075】

【数11】

$$I(x, y) = |E(x, y)|^2 |E_0| \int_0^\infty \exp[ik \sin \theta (x \cos \phi + y \sin \phi)] \exp(-im\phi) d\phi d\theta^2$$

【0076】この式において、 $E(x, y)$ は電場ベクトル、 E_0 は電場ベクトルの振幅である。ここで、 $m=1$ とすると、上式は、一次のベッセルビームになる。この一次のベッセルビームは、光軸上で電場強度がゼロとなる特異点をもち、実は、次式の電磁波の波動方程式を解くことで、得られる。

【0077】

【数12】

$$\Delta E(x, y) - \mu \varepsilon \frac{\partial E(x, y)}{\partial z} = 0$$

【0078】ある軸について軸対称な境界条件を与えれば、数12は (r, ϕ, z) 円筒座標系で次式のように書き直すことができる。

【0079】

【数13】

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial E}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 E}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 E}{\partial z^2} + k^2 E = 0$$

【0080】ここで、 k は波数を示し、改めて図15に例示した座標系を用いれば、ベッセル関数を重ね合わせで表現できる数11の解が得られる。図16は、 $m=1$ とした場合の一次ベッセルビームのビーム面、つまり端面の位相分布を例示したものである。この図16から明らかなように、一次ベッセルビームは、その光軸と直交する面内において、光軸の周りを一回転したときに0から 2π まで連続的に変化する位相分布を有しており、軸対称にある電場の位相がお互い π だけずれているので、電場が光軸上において完全に打ち消し合ってゼロとなるため、電場強度が光軸上でゼロとなる特異点を持つことがわかる。

【0081】つまり、この発明の顕微鏡システムは、イレース光の集光ビームをたとえば集光光学系を用いてベッセルビーム、特に一次のベッセルビーム、とすることにより、照射領域の中央部に蛍光領域が残る、理論通り

の解像度を有するようになる。さらに、このベッセルビームは、図17に例示した2次元強度分布であるプロファイルのように、見かけ上拡散しない疑似非回折ビームである。

【0082】従来の顕微鏡では、回折限界を小さくして解像度を高めるために開口数が多い対物レンズを使用するので、焦点深度が極めて浅くなり、ピント合わせが困難であったが、この発明の顕微鏡システムでは、イレース光の集光ビームとしてのベッセルビームが疑似非回折ビームであるので、実質的に焦点深度が深くなり、ピント合わせの問題が軽減されることとなる。さらに、顕微鏡本体においては、イレース光により解像度が支配されるので、解像度を低下させることなく、その操作性が高められる。

【0083】上述のような光学的特性を有するベッセルビームを一例としたイレース光の集光ビーム、つまり、光軸について軸対称な境界条件を持ち、光軸に関する対称位置において π だけ位相がずれた位相分布を有している集光ビームの形成は、既存の光学素子を用いた集光光学系によって簡単に行うことができる。光軸について軸対称な境界条件を与えるために、集光光学系は、たとえば、輪体腔を持つ反射型対物レンズなどの輪帯光学系、つまり輪体開口を持つ光学系や、フレネルゾーンプレートなどの回折光学系や、アキシコンなどを備えていることが好ましい。

【0084】また、光軸に関する対称位置において π だけ位相がずれた位相分布を与えるために、集光光学系は、光軸に対して直交する平面内で位相差分布を与えるような屈折率分布または光路差分布を有する位相板を備えていてもよい。たとえば、完全な一次ベッセルビームのように、光軸と直交する面内において光軸の周りを一回転したときに0から 2π まで連続的に変化する位相分布を有する集光ビームは、図18に例示したように、ビームの光軸と直交する面内において、その光軸の周りを回転する方向に位相板が一回転したとき、その屈折率分

(図7) 001-100102 (P2001-100102A)

布または光路差分布が0から 2π まで連続的に変化して、形成される。

【0085】なお、完全な一次ベッセルビームでなくとも、光軸と直交する面内において光軸の周りを一回転したときに0から 2π まで不連続的に変化する位相分布を有する集光ビームならば、屈折率分布または光路差分布が0から 2π まで不連続的に変化しても、形成できる。イレース光の光源には、このような集光ビームを形成する機能を持たせるようにしてもよい。

【0086】また、イレース光光源としてのレーザーの共振器内に、透過型の輪帯型回折格子や、リング状の輪帯ミラー、フレネルゾーンアレイ、輪帯アパーチャ、光軸と直交する面内の電場に関して軸対称にある電板の互いに π だけずれた位相差を与える位相板などを挿入して、上述した境界条件を与えて直接イレース光自体を一次ベッセルビームにしてしまうことも可能である。

【0087】さらにまた、イレース光光源としてのレーザーの共振器の境界条件を調整して、TEM₁₁等の光軸上において強度がゼロで軸対称のモードパターンを形成し、このモードパターンを上述した輪体開口を持つ回折光学系で集光することにより、たとえば、高次のモードパターンを持つ、ガウス型、ラグエル型またはエルミート型のいずれかの発振モードのレーザービームを、イレース光の集光ビームとしてもよい。

【0088】一方、この発明の顕微鏡システムの顕微鏡本体においては、さらに、中空ビームで試料粒子を捕獲および移動することのできる、マイクロマニピュレータ機能をも有することができる。中空ビームを照射すると、試料粒子は、レーザー強度の強い領域に吸引されて、その安定点が中空ビームの集光点位置の中空部になって、中空ビーム内に完全に封印されて捕獲されるようになる。この発明の顕微鏡本体では、捕獲対象の試料にはほとんどレーザー光が照射されないで、試料へのダメージを抑制することができる。さらに、その空間移動は、通常のレーザービームのように、ガルバノミラー等の光学系によるビーム走査で実現できる。

【0089】また、捕獲に適切なレーザー強度は、約数10MW/cm²であることが知られており、この強度は、この発明の顕微鏡システムにおける顕微鏡本体で用いられるイレース光の最大強度とほぼ等しいので、上述したイレース光の光源および集光光学系をそのまま利用できる。従って、この発明の顕微鏡システムでは、中空ビームを用いることで、試料を、光照射によるダメージを与えることなく、捕獲および移動させることができ、高度なマイクロマニピュレータ機能を有することができ。

【0090】以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。

【0091】

【実施例】（実施例1）この発明の顕微鏡システムにおいて、調整された試料が、Rhodamine6Gにより染色されたものであり、顕微鏡本体が、ポンプ光（つまり、Rhodamine6Gを基底状態S₀から第一電子励起状態S₁へ励起させる波長 λ_1 の光）の光源およびイレース光（つまり、第一電子励起状態S₁のRhodamine6Gを第二電子励起状態S₂へ励起させる波長 λ_2 の光）の光源としてYAGレーザーを備えているとする。また、YAGレーザーの波長変調素子として、ラマンシフターも備えているとする。

【0092】Rhodamine6Gは、上述したように、二重共鳴吸収と誘導放出とによる優れた蛍光抑制を実現させることができ、そのS₀からS₁への励起波長 λ_1 は532nm、S₁からS₂への励起波長 λ_2 は560nmであるので、YAGレーザーの二倍高調波光（=532nm）をポンプ光とし、その二倍高調波をラマンシフターで560nmに波長変調したものをイレース光とする。

【0093】下記の表1は、532nmおよび560nmにおけるRhodamine6Gの光学パラメータを例示したものである。

【0094】

【表1】

S ₀ →S ₁ 吸収断面積	$\sigma_{01} : 4 \times 10^{-17} \text{cm}^2$ (532nm)
S ₁ →S ₂ 吸収断面積	$\sigma_{12} : 1 \times 10^{-17} \text{cm}^2$ (560nm)
蛍光発光面積	$\sigma_f : 2 \times 10^{-17} \text{cm}^2$ (560nm)
蛍光寿命	$\tau : 3 \text{ns}$ 以上

【0095】さらに、顕微鏡本体に備えられた集光光学系によってイレース光を集光して得られるビームは、その光軸と直交する面内で、光軸に関する対称位置において π だけ位相がずれ、且つ光軸の周りを一回転したときに0から 2π まで連続的に変化した位相分布を有しているとする。そして、集光光学系は、このような位相分布をイレース光の集光ビームに与えることのできる、図1

8に例示したような屈折率分布または光路差分布を有する位相板を備えている。

【0096】このようなこの発明の顕微鏡システムにおける顕微鏡本体の分解能の高さは、前記の一次ベッセルビームの一般式である数11で表される。この分解能の高さは、イレース光の集光光学系の開口数が、図19のように具体的に与えられていると、次式のようなコンボ

(数8) 01-100102 (P2001-100102A)

リューション計算の形式で書き直すことができる。
【0097】

【数14】

$$I(x,y) = |E(x,y)|^2 \left| E_0 \iint_{x',y' \in \Omega} \text{PSF}(x-x',y-y') \exp[-i\phi(x',y')] x' dy' \right|^2$$

【0098】この式において、PSF(x,y)は光学系の2次元点像分布関数、 $\phi(x,y)$ は位相分布、 a は積分領域の半径を示している。また、集光光学系が輪帯光学系である場合には、PSF(x,y)は、次式で与えられる。

【0099】

【数15】

$$\text{PSF}(x,y) = \frac{2J_1(2\pi\xi)}{2\pi\xi} - \frac{2\rho_0 J_1(2\pi\xi)}{2\pi\xi}$$

【0100】但し、 ρ_0 は集光光学系の瞳の遮光率であり、 ξ は次式となる。

【0101】

【数16】

$$\xi = \frac{NA}{\lambda} \sqrt{x^2 + y^2}$$

【0102】但し、NAは集光光学系の開口数、 λ はイ

レース光の波長を示している。数15において、 ρ は、0~1の間で値を取り、0のときは、集光光学系が輪帯光学系ではない場合のPSF(x,y)を示す。ここで、数14で与えられるI(x,y)を前記の数8に代入すれば、S1の分子が均一に分布した試料面にイレース光を照射したときの蛍光強度 $F_1(x,y)$ を次式のように求めることができる。

【0103】

【数17】

$$F_1(x,y) = \Phi(I_0 \sigma_{01} N_{01} t) \cdot e^{-\left(\sigma_{12} I(x,y) + \frac{1}{\tau}\right) t}$$

【0104】さらに、蛍光抑制に誘導放出が寄与する場合には、誘導放出断面積を σ_f として、数17は数18となる。

【0105】

【数18】

$$F_1(x,y) = \Phi(I_0 \sigma_{01} N_{01} t) \cdot e^{-\left((\sigma_{12} + \sigma_f) I(x,y) + \frac{1}{\tau}\right) t}$$

【0106】したがって、蛍光ラベラー分子がRhodamine6Gであり、イレース光の集光ビームが上述したような位相分布を有している場合では、この数18を用いて、Rhodamine6Gが第一励起状態から基底状態へ脱励起する際に発光する蛍光を、どの程度の空間分解能で検出できるかを見積もることができる。そこで、本実施例1にお

けるこの発明の顕微鏡システムの顕微鏡本体が検出できる空間分解能を、数18により求めた。

【0107】表2は、この際に用いた環境パラメータを例示したものである。

【0108】

【表2】

集光レンズ開口数	0.75
光学系瞳の遮光率	0.95
レーザー光パルス幅	160ps
ポンプ光波長	532nm
イレース光波長	560nm
イレース光フォトンフラックス	9.6×10^{10} photons/sec/cm ²
イレース光レーザー強度	34W/cm ²

【0109】また、Rhodamine6Gの光学パラメータは上記表1の値を用いた。なお、ポンプ光のフォトンフラックスは指定していないが、Rhodamine6Gの場合では、YAGレーザーの二倍高調波の波長帯域における σ_{12} が十分な数のS1を生成できる大きな吸収断面積であるとして、特にS1の生成量と均一性の論議は無視している。

【0110】図20は、算出されたイレース光強度I(x,y)と蛍光強度 $F_1(x,y)$ とを例示したもの

である。なお、各強度はそれぞれのピーク値で規格化している。この図20から明らかなように、イレース光強度はその中央部においてゼロとなっており、蛍光強度も中央部において高く、蛍光領域が中央部にのみ残っていることがわかる。集光光学系のRayleigh-limitは、455nmであるが、もし蛍光強度 $F_1(x,y)$ の半価幅をRhodamine6Gを検出できる空間分解能と定義すると、それは100nmとなり、集光光学系の回折限界を上回

(包 9) 101-100102 (P2001-100102A)

っている。つまり、本実施例におけるこの発明の顕微鏡システムの顕微鏡本体は、優れた超解像性を有していることがわかる。

【0111】一方、ポンプ光およびイレース光の光源としているYAGレーザーとしては、廉価で、安定性の高いモードロック型のものを用いることができ、たとえば、ポンプ光としての二倍高調波523 nm光の一部をビームスプリッターで取り出し、これを、安全性のよいBBO結晶などの非線形結晶や、ラマンシフターなどの波長変調素子または非線形媒質で560 nmに波長変換して、イレース光とする。このように光源の構成は極めて簡単なものとなる。

【0112】また、YAGレーザーが、モードロック型であり、且つ半導体レーザー副起型である場合には、繰り返しが高い100 MHz、且つ数10 psecの短パルス光を得ることができるとともに、光源を小型でソリッドステートのメンテナンスフリーであるものとすることができる。さらには、照射光の強度が低くよく、また、照射光波長が生体試料の光吸収帯域ではない500 nm近辺であるので、生体試料へのダメージを極めて少なくすることができる。

【0113】また、Rhodamine6Gと同様に、たとえば、7-Ethylamino-4-trifluoromethylcoumarin($C_{12}H_{10}NO_2F_3$: Coumarin500)は、前述したように、ポンプ光とイレース光が、YAGレーザーの二倍高調波と四倍高調波で対応することができ、イレース光の強度を100 MW/cm²として、Rhodamine6Gと同じ100 nm程度の空間分解能を得ることができる。

【0114】また、Rhodamine6Gや7-Ethylamino-4-trifluoromethylcoumarinとは異なり、YAGレーザーの基本波とその高調波を簡単な非線形結晶で変調して生成できる波長ではない共鳴波長 λ_1 および λ_2 を有する分子の場合には、YAGレーザーの発振波長を、たとえば、オプティカルパラメトリックオシレータ(OPO)などのような、非線形結晶を用いた光学システムで変調することにより、紫外から赤外までの範囲で走査することができる。

【0115】もちろん、YAGレーザーであるので、従来用いられてきた色素レーザーなどと比べ、色素の交換などを行う必要がなく、顕微鏡本体の操作性が向上される。

(実施例2) 上述の実施例1では、イレース光の集光ビームを、光軸の周りを一回転したときに0から 2π まで連続的に変化した位相分布を有したものとしているが、本実施例2では、不連続的に変化した位相分布を有したものとする。

【0116】不連続的に変化した位相分布をイレース光の集光ビームに与えるには、たとえば、図21に例示したように、光軸周りに不連続に変化する屈折率分布($n_1 \sim n_8$)を有する位相板を用いる。ここで、たとえ

ば、蛍光ラベラー分子をRhodamine6Gとし、その光学パラメータおよび環境パラメータをそれぞれ表1および表2とした場合において、顕微鏡本体の集光光学系が、図22に例示したように光軸周りを四分割し、 $0, \pi/2, \pi, 3\pi/4$ と、飛び飛びの不連続位相分布をイレース光の集光ビームに与える屈折率分布を有する位相板を備えているとして、イレース光の集光ビームの強度分布と、発光される蛍光の強度分布とを求めた。

【0117】図23(a)(b)は、各々、位相板の構造と光学パラメータを例示した平面図および側面図である。この図23(a)(b)に例示した位相板は、ガラス基板(BK-7)上にフッ化マグネシウム膜がコートされて形成されている。フッ化マグネシウム膜は、波長560 nmにおいて屈折率が1.38であるので、膜厚350 nmで $\lambda/4$ の位相差を与える。よって、光軸周りを四分割した各領域において $0, \pi/2, \pi$ 、および $(3\pi)/2$ の位相分布を与えることのできる各膜厚は、それぞれ、図23(a)に例示したように、350 nm、700 nm、1050 nm、および0 nmとなる。

【0118】また、このような屈折率分布を有するフッ化マグネシウム膜などの光学薄膜をコーティングする他にも、ガラス基板を直接エッチングすることにより、各領域の位相を与える光路差を有するようにして位相板を形成してもよい。なお、このように光学薄膜のガラス基板上へのコーティングまたはガラス基板のエッチングにより形成される位相板では、イレース光の位相面の乱れを防ぐために、ガラス基板自体の平行度や粗さが入/4の位相差を与える光路差より小さい必要がある。

【0119】つまり、フッ化マグネシウム膜を用いた位相板では、ガラス基板自体の平行度や粗さによる光路差の乱れが350 nm以下としている。図24は、このような図23の位相板を備えた集光光学系により集光されて得られたイレース光の集光ビームの強度と蛍光強度とを例示したものである。この図24から明らかなように、イレース光の集光ビーム強度は、実施例1における図20に例示したイレース光集光ビーム強度とほぼ同じ形状となっており、中央部の光強度がゼロとなっていることがわかる。

【0120】つまり、イレース光の集光ビームが、光軸周りに不連続的に変化した位相分布を有している場合でも、優れた超解像性が実現される。また、位相板の製作において、光軸周りに不連続的に変化した屈折率分布または光路差分布を有するように、たとえばフッ化マグネシウム膜を製膜することは、連続的に変化するよりも、極めて簡単であり、製作コストの低減を図ることができる。

【0121】(実施例3) この発明の顕微鏡システムでは、波長 λ_2 光であるイレース光を集光して得られるビームが、非回折ビームである一次ベッセルビームである

(20) 01-100102 (P2001-100102A)

ことが最も望ましいが、顕微鏡本体を理論通りの超解像度を有するものとするには、前述したように、中央部の強度がゼロとなる形状を有していれば良い。

【0122】したがって、図18または図22に例示したような位相板で位相変調されたビームを、通常の集光光学系、つまり実施例1のように輪帯光学系を備えていない集光光学系によって、縮小結像するだけでよく、非回折性はなくなるが、優れた超解像性を実現することはできる。図25は、試料がRhodamine6Gにより染色されたものであり、瞳の透光率をゼロとし、光学パラメータおよび環境パラメータを表1および表2の値とした場合で、算出したイレース光集光ビームの強度分布および蛍光強度分布を例示したものである。

【0123】この図25から明らかなように、位相板を備えた通常の集光光学系によって集光されたビームは、その中央部の強度がゼロとなる形状を有しており、中央部に蛍光領域が残っている。集光光学系のRayleigh-limitは455nmであるが、もし蛍光強度 $F_1(x, y)$ の半値幅をRhodamine6Gを検出できる空間分解能とすると、それは200nmとなり、集光光学系の回折限界を上回っている。したがって、優れた超解像性が得られていることがわかる。

【0124】(実施例4) 図26は、超解像顕微鏡機能を有するこの発明の顕微鏡システムの一例を示した要部構成図である。この図26に例示した顕微鏡システムでは、蛍光ラベラー分子としてRhodamine6Gを用いている。つまり調整された試料(100)を、Rhodamine6Gにより染色したものである。

【0125】波長 λ 1光であるポンプ光および波長 λ 2光であるイレース光の光源として、モードロック型のNd:YAGレーザー(1)が備えられ、その波長変換用の非線形媒質としての非線形結晶であるBBO結晶(2)が備えられており、このNd:YAGレーザー(1)の基本波をBBO結晶(2)により波長変換して、二倍高調波532nmを発振させ、これをポンプ光としている。

【0126】このポンプ光の光路上にはハーフミラー(3)が備えられており、このハーフミラー(3)によって、二倍高調波の一部、つまりポンプ光の一部を取り出し、非線形結晶としてのBa(NO₃)₂結晶で構成されたラマンシフター(4)によって、563nmに波長変換し、これをイレース光としている。このイレース光は、ミラー(5)を介して、実施例2において例示した位相板(6)に照射されて、この位相板(6)によって中央部の電場強度がゼロとなる中空ビームに成形される。

【0127】この中空ビームとして成形されたイレース光とポンプ光は、ダイクロックミラー(7)により同じ光路を通るようにされ、そして、次のダイクロックミラー(8)および集光対物レンズ(9)を介して、図中の

矢印方向に移動する二次元移動ステージ(10)に設置されている、調整された試料(100)上に集光される。

【0128】このようにして集光されたポンプ光およびイレース光の照射により、調整された試料(100)から発光する蛍光は、ダイクロックミラー(8)により反射され、蛍光集光レンズ(11)によって、シャープカットフィルター(12)およびピンホール(13)を介して、フォトマル(14)の受光面に集光される。ダイクロックミラー(8)は、ポンプ光およびイレース光を透過し、蛍光帯域で反射率をもつ干渉フィルターである。このため、ポンプ光およびイレース光と、シグナル光である蛍光との分別が可能となっている。

【0129】また、ダイクロックミラー(8)とフォトマル(14)との間に配設されているシャープカットフィルター(12)は、ダイクロックミラー(8)などの表面散乱により混入したポンプ光およびイレース光をカットする帯域フィルターであり、ピンホール(13)は、同じく空間的に拡散した迷光をカットする空間フィルターとして機能するものである。これらシャープカットフィルター(12)およびピンホール(13)によって、蛍光の検出感度の向上と、S/N比の向上が図られる。

【0130】このような構成を有するこの発明の顕微鏡システムにおいて、Nd:YAGレーザーのパルス光の照射のタイミングと同期して、二次元移動ステージ(10)を移動させながら、蛍光の強度をモニターすることにより、調整された試料(100)の2次元蛍光画像を得ることができる。なお、ポンプ光とイレース光の強度はフォトマル(15)によりモニターしており、たとえば、信号処理を加えることでレーザー光の強度変換による各ピクセルごとの画像信号の変動を抑制でき、画質の向上を図ることができる。

【0131】もちろん、このような図26に示した例において、各構成要素については様々な態様が可能であり、また、他の機能の付加も可能である。たとえば、集光対物レンズ(9)としては、通常の光学レンズを用いれば、集光点中央で強度がゼロとなるイレース光集光ビームを形成することができ、また、光軸の周りを周囲する対称な境界条件を与えるものを用いれば、非回折ビームである一次ベッセルビームを形成することができる。

【0132】以下に一次ベッセルビームを形成することのできる集光対物レンズ(9)としての光学系を例示して説明する。

(I) 輪帯光学系

この輪帯光学系としては、たとえば図27に例示したような、環状の輪帯スリット(16)と通常のガラスレンズ(17)とが組み合わされてなるものがある。環状の輪帯スリット(16)を用いる場合には、たとえば、輪帯スリット(16)の前にエタロン(図示していない)

(21) 01-100102 (P2001-100102A)

を配置させ、その一次回折光を利用して、通過する光量を増加させることが望ましい。

【0133】また、輪帯面をもとと有する輪帯光学系もあり、それ自体が一次ベッセルビームの形成に必要な境界条件を持っている。この輪帯面をもとと有する輪帯光学系としては、たとえば、図28に例示したような反射対物レンズなどがある。この反射対物レンズは、カセグレンまたはシュバルツシルド型光学系であり、内側に配置されている凸曲面の反射ミラーが、光学軸の中央部を遮蔽しており、実質上、上記の環状輪帯スリット(16)と同様な役割を果たしている。反射型光学系としては、図29に例示したような斜入射型のWalter型レンズもある。このWalter型レンズは、極端な輪帯光学系であり、ほぼ理想的な環状輪帯スリットを用いたことと等価になる。

【0134】(II) 回折光学系

軸対称な回折光学系(透過型および反射型を含む)も、光軸の周りを周回する対称な境界条件を前記の数12の波動方程式に与えるので、集光光学系として適用することができる。この回折光学系としては、たとえばフレネルゾーンプレートがある。図30(a)(b)は、各々、透過型および反射型のフレネルゾーンプレートを例示したものである。フレネルゾーンプレートは、もともと結像能力を有しているので、集光能力と一次ベッセルビーム形成に必要な境界条件とを併せ持っている。

【0135】また、単に、境界条件を与えることのみを目的とする場合には、図31に例示したように、同心円上に溝や螺旋溝が切られてなる回折格子が備えられていてもよい。

(III) アキシコン

アキシコンも軸対称の光学系であり、軸上の点光源をその軸上の広い範囲に渡って結像させることができる。図32は、アキシコンの一例を示したものである。この図32に例示したアキシコンは、円錐面とメッキした平面とを有する、マクレオードと呼ばれる反射レンズである。このアキシコンは、ある範囲で軸上の点に対し必ず軸上同一点が存在し、軸外の点に対してはそれと対称の点に像点が存在する。このようなアキシコンも光軸の周りを周回する対称な境界条件を与えるものである。

【0136】以上のような光学系を集光対物レンズ

(9)として備えることができる。また、図26に示した例において、蛍光検出器としては、フォトマルのような光電子倍増管以外にも、PINフォトダイオードやCCD等の半導体検出器が備えられていてもよい。Rhodamine6Gを蛍光ラベラー分子とした場合には、光源についても別的手段が可能である。たとえば、イレース光を生成するためには、ラマンシフター(4)の代りに、OPQや色素レーザーを用いることも可能ではある。この場合には、イレース光が波長可変となるためラベラー分子として、Rhodamine110などのローダミン系分子を利用す

ることができる。

【0137】さらにまた、図26の顕微鏡システムでは、調整された試料(100)の二次元蛍光画像を得るために、二次元移動ステージ(10)を集光ビームに対して相対的に二次元移動させるようになっており、この他にも、たとえば、従来のレーザー走査型顕微鏡のように、直接、ガルバノミラーなどにより光学系を振動させて、ビーム自体で調整された試料(100)上を二次元走査することもできる。

【0138】(実施例5)図33は、共焦点型の超解像顕微鏡機能を有するこの発明の顕微鏡システムの一例を示した要部構成図である。この図33に例示した顕微鏡システムでは、調整された試料(100)が、Coumarin500により染色されたものとしている。

【0139】ポンプ光およびイレース光の光源として、モードロック型のNd:YAGレーザー(1)が備えられており、このNd:YAGレーザー(1)の基本波(1064nm)はハーフミラー(28)によって二系統に分岐される。分岐された一方の基本波は、BBO-1結晶からなる三倍波発生器(18)により355nmに波長変換されて、ポンプ光とされる。他方の基本波は、ミラー(29)を介してBBO-2結晶からなる二倍波発生器(19)に入射され、この二倍波発生器(19)により355nmに波長変換されて、イレース光とされる。

【0140】イレース光は、ミラー(30)を介して、実施例2において例示したような位相板(31)に照射され、この位相板(31)によって中央部が電場強度がゼロとなる中空ビームに成形される。この中空ビームとされたイレース光とポンプ光は、ダイクロックミラー(20)により同じ光路を通るようにされる。

【0141】また、このダイクロックミラー(20)と三倍波発生器(18)との間には、偏光子(21)が配設されており、この偏光子(21)によって、ポンプ光の偏光面を自由に回転できるようになっている。ダイクロックミラー(20)により同軸上に光路を揃えられたポンプ光およびイレース光は、シュバルツシルド型反射光学系であるコンデンサーレンズ(22)によりピンホール(23)を照明する。

【0142】集光されたポンプ光およびイレース光により照明されたピンホール(23)の像は、あらかじめマイクロビーム形成用の光源として用いられる。ピンホール(23)を通過したポンプ光およびイレース光は、ダイクロックミラー(24)を透過し、シュバルツシルド型反射光学系である対物レンズ(25)によって、二次元移動ステージ(10)上に設置されている、調整された試料(100)上に、集光される。

【0143】シュバルツシルド型反射光学系であるコンデンサーレンズ(22)および対物レンズ(25)は、アルミなどの金属膜がコーティングされた各鏡面を有し

(22) 101-100102 (P2001-100102A)

ており、赤外から紫外領域までの広い波長領域の光を色収差なく結像できる。したがって、波長の異なるポンプ光とイレース光とを、全く同じ結像性能、且つ高分解能で、調整された試料(100)上に集光できる。このシュバルツシルド型反射光学系は、輪帯光学系であり、内側に配置されている凸面鏡の半径を調整して、遮光率 ρ を0から1の間の値とすることで、一次ベッセルビームの形成に必要な境界条件を与える。

【0144】集光されたポンプ光およびイレース光の照射により、調整された試料(100)から発光する蛍光は、対物レンズ(25)を介して、ダイクロックミラー(24)により反射される。この際、ポンプ光とイレース光の散乱光や迷光は、ダイクロックミラー(24)で反射されないで、信号光である蛍光光のみを分別できる。

【0145】そして、ダイクロックミラー(24)により反射された蛍光光は、ピンホール(26)を通過し、シャープカットフィルター(27)によってポンプ光とイレース光の残光がカットされて、フォトマル(14)の受光面に集光される。このような図33に例示したこの発明の顕微鏡システムにおける顕微鏡本体の光学系は、共焦点光学系である。すなわち、ピンホール(23)および(26)は、調整された試料(100)上の集光点を中心にして光学的に共焦点位置にある。このため、同等の共焦点光学系を有する走査型レーザー蛍光顕微鏡と同様にS/N比に優れ、しかも二次元移動ステージ(10)の光軸方向の移動により、調整された試料(100)の三次元の蛍光画像を得ることができる。

【0146】また、偏光子(21)によって、超解像機能の他に新たな有用な機能が付加されている。一般に、分子は特定の方向の電気ベクトルに対して吸収が強くなり、たとえば、ベンゼン誘導体やプリン誘導体は分子平面の平面方向と同じ方向の電気ベクトルを持つ光を吸収する。その場合、ポンプ光の偏光方向を回転させることによって、特定の方向に空間配向した分子のみを励起し、蛍光を起こさせることができる。したがって、偏光子(21)により、ポンプ光の偏光方向を変えながら、蛍光画像を撮ることで、調整された試料(100)の特定の分子あるいは組織の空間的配向特性を分析できるようになる。

【0147】(実施例6)図34は、この発明の顕微鏡システムの他の一例を示した要部構成図である。この図34に例示した顕微鏡システムは、超解像顕微鏡機能の他に、中空マイクロビームを用いたマイクロマニピュレータ機能をも有している。さらに、通常の蛍光顕微鏡機能も持ち合わせ、レーザー走査を少なくとも常にリアルタイムで、調整された試料(100)からの蛍光像をモニターできるようにしている。

【0148】この図34に例示した顕微鏡システムにおいて、調整された試料(100)は、Rhodamine6G によ

り染色されたものとなっている。超解像顕微鏡機能のためのポンプ光とイレース光の光源および波長変換用の非線形媒質として、モードロック型のNd:YAGレーザー(32)および非線形結晶であるKTP結晶(35)が備えられている。また、マイクロマニピュレータ機能用の中空マイクロビームを形成するためのレーザー光源および波長変換用の非線形媒質として、連続発振CWのNd:YAGレーザー(33)およびKTP結晶(36)が備えられている。さらにまた、通常の蛍光顕微鏡機能のための光源として、水銀ランプ(31)も設けられている。

【0149】まず、超解像顕微鏡機能について説明する。Nd:YAGレーザー(32)の基本波はKTP結晶(35)により波長変換されて、ポンプ光としての532nmの二倍高調波が発振される。このポンプ光の一部は、ハーフミラー(37)により取り出されて、ミラー(38)を介して、Ba(NO₃)結晶で構成されたラマンシフター(39)に入射され、このラマンシフター(39)により563nmに波長変換されて、イレース光とされる。

【0150】イレース光はダイクロックミラー(40)に入射し、このダイクロックミラー(40)によって、混入した532nmの二倍高調波がカットされて、563nmの光のみが純度良く抽出される。このイレース光は、さらに、実施例2において例示したような位相板(6)により、中央部で電場強度がゼロとなる中空ビームに成形される。

【0151】この中空ビームに成形されたイレース光とポンプ光とは、ダイクロックミラー(41)により同じ光路を通過するようにされる。ハーフミラー(37)とダイクロックミラー(41)の間には偏光子(21)が設置されており、この偏光子(21)によってポンプ光の偏光面を自由に回転できるようになっている。

【0152】ダイクロックミラー(41)により同軸上に光路を揃えられたポンプ光およびイレース光は、さらにリレーレンズ(42)により成形された後、ハーフミラー(43)により反射されて対物レンズ(9)に入射し、この集光対物レンズ(9)によって、二次元移動ステージ(10)上に設置されている、調整された試料(100)上に集光される。

【0153】ポンプ光およびイレース光の照射によって調整された試料(100)から発光する蛍光は、ハーフミラー(43)および(44)を透過し、ハーフミラー(45)によってレンズ(46)に入射する方向に反射される。そして、レンズ(46)によってピンホール(47)の中央に集光された後、レンズ(48)を介してスペクトルメーター(49)に入射する。

【0154】ピンホール(47)は、空間フィルターとして機能し、調整された試料(100)以外、たとえば光学系など、から発する蛍光等をカットして、測定のス

(23) 01-100102 (P2001-100102A)

／N比を高める役割をする。また、この図34に示した例では、蛍光検出器としてスペクトルメーター(49)が備えられているため、単に蛍光強度を測定するだけでなく、蛍光スペクトルの観測やレーザー照射に対する時間応答の測定をも行うことができるので、調整された試料(100)の化学構造や組成の解析ができる。さらに、偏光子(7)によって、ポンプ光とイレース光の偏光面を相対的に変化させることで、組成の空間配向情報も得られる。

【0155】このように、調整された試料(100)に対する様々な測定や解析を行うことができる、非常に優れた超解像顕微鏡機能を有している。次に、マイクロマニュピュレート機能について説明する。マイクロマニュピュレートにおいて粒子を捕獲する場合は、基本的に、連続発振光源を用いる必要があるため、連続発振光源として、CWのNd:YAGレーザー(33)が備えられている。

【0156】このNd:YAGレーザー(33)の基本波がKTP結晶(36)により波長変換されて532nmの二倍高調波が発生される。この二倍高調波を、マイクロマニュピュレートに用いる中空マイクロビーム生成用の光源としている。ハーフミラー(38)を通過した二倍高調波は、ラマンシフター(39)によって563nmに波長変換され、さらに、ダイクロックミラー(40)により、混入した532nmの二倍高調波がカットされて、563nmの光のみが純度良く抽出される。

【0157】この563nm光は、位相板(6)により、中央部で電場強度がゼロとなる中空マイクロビームに成形され、ダイクロックミラー(41)およびリレーレンズ(42)を通過して、ハーフミラー(43)により集光対物レンズ(9)に入射するように反射される。そして、集光対物レンズ(9)により、調整された試料(100)上に集光される。

【0158】このように、マイクロマニュピュレート用の563nm中空マイクロビームは、上述した超解像顕微鏡用のイレース光と同じ光学系を用いることができる。「光ピンセット」と称されている従来のマイクロマニュピュレートでは単一の粒子しか移動させることができなかったが、この中空マイクロビームを用いたマイクロマニュピュレートは、中空マイクロビーム内に複数の粒子を閉じ込めることができ、「光ピンセット」として機能することができる。もちろん、レーザー強度も非常に弱くてすむので、試料へのダメージを減少させることができる。

【0159】実際のマイクロマニュピュレートの際には、全体の顕微鏡像をモニターしながら操作するので、顕微鏡像をモニターするための通常の蛍光顕微鏡機能をも付加されている。この蛍光顕微鏡機能のための光源としては水銀ランプ(31)が備えられており、この水銀ラン

プ(31)からの光は、ハーフミラー(44)、ハーフミラー(43)および集光対物レンズ(9)を介して、調整された試料(100)上に照射される。そして、この光照射により発光した蛍光像は、ふたたび、集光対物レンズ(9)、ハーフミラー(43)およびハーフミラー(44)を介して、CCDカメラ結像レンズ(50)に入射し、このCCDカメラ結像レンズ(50)によって、CCDカメラ(51)の受光面上に直接結像される。この蛍光像は、直接、CRT上で随時モニターできる。

【0160】したがって、CRT上の蛍光像を見ながら、中空マイクロビームにより、たとえば赤血球などの粒子を、高度にマイクロマニュピュレートすることができる。

(実施例7)この発明の顕微鏡システムでは、顕微鏡本体を優れた超解像性および操作性とするために、イレース光を集光して得られるビームを、一次ベッセルビームとすることが望ましい。

【0161】一次ベッセルビームの成形は、上述したように集光光学系に備えられる位相板や、輪帯光学系、回折光学系、アキシコンなどを用いて行う他にも、イレース光の光源としての気体レーザー、固体レーザーまたは半導体レーザーの共振器内に一次のベッセルビームを形成するのに必要な境界条件を与えることで、イレース光自体を一次ベッセルビームとすることが可能である。

【0162】図35は、その境界条件を兼ね備えたレーザー共振器の一例を示した要部構成図である。この図35に例示したレーザー共振器は、通常の焦点距離 f のレンズ(53)、位相板(54)、出力ミラー(55)を備えており、さらに、端面の共振器ミラーとして、リング状の輪帯ミラー(52)を備えている。

【0163】このリング状輪帯ミラー(52)内でビーム光軸に対して軸対称な境界条件が与えられ、さらに、光軸と直交する面内の電場に関して軸対称にある電場が互いに π だけずれた位相差をビームに与える位相板をレーザー共振器内に設けることにより、一次ベッセルビームを直接発生させることができる。このようなリング状輪帯ミラー(52)や位相板をレーザー共振器内に設けて境界条件を与えることにより、顕微鏡本体の集光光学系の構造を単純にし、アライメントなどを非常に簡単なものとすることができる。

【0164】図36は、Nd:YAGレーザー(56)が図35に例示した構成のレーザー共振器を持つ場合の、この発明の顕微鏡システムの一例を示した要部構成図である。この図36に示した例では、調整された試料(100)がRhodamine6Gにより染色されたものであるとし、光源として、図35に例示した構成のレーザー共振器を持つモードロック型のNd:YAGレーザー(56)が備えられている。

【0165】このNd:YAGレーザー(56)は、直

(図4) 01-100102 (P2001-100102A)

接一次ベッセルビームの基本波を発生させることができ、この基本波をKTP結晶(57)によって532nmの二倍高調波に波長変換して、ポンプ光として、また、その二倍高調波の一部をBa(NO₃)₂結晶からなるラマンシフター(4)により563nmに波長変換して、イレース光とする。

【0166】このイレース光は、すでに一次ベッセルビームであるので、集光光学系において、前述した実施例におけるイレース光を中空ビームとする位相板(6)や、一次ベッセルビームとする輪帯光学系などの光学系を備える必要がなく、そのままダイクロックミラー(7)(8)および集光対物レンズ(9)を介して、調整された試料(100)上に集光させることができる。

【0167】もちろん、調整された試料(100)上の集光ビームは、一次ベッセルビームとなっている。このように一次ベッセルビームを形成する光学系が全てレーザー内に強固に組み込まれていることにより、簡単な構成であるとともに、すれに強く、安定性に優れた集光光学系となり、超解像性および操作性をさらに向上させることができる。

【0168】一次ベッセルビームを形成する境界条件を与えることのできる光学系としては、上記のリング状の輪帯ミラー(52)や光軸と直交する面内の電場に関して軸対象にある電場が互いに π だけずれた位相差をビームに与える位相板の他にも、輪帯回折格子、フレネルゾーンプレート、輪帯アパーチャーなどを、イレース光レーザー光源の共振器内に備えることができる。

【0169】なお、一般に、レーザーは、その共振器の構成によって、様々なモードパターンをもつビームパターンを生成することができるので、ガウス型、ラゲル型またはエルミート型の高次発振モードでは、図37(a)~(d)に例示したように、レーザービームの中央部で強度がゼロとなるパターンが存在する。よって、光源としての各種レーザーは、そのレーザー共振器を図35に例示したような構成とする他にも、ガウス型、ラゲル型またはエルミート型の高次発振モードをもつレーザービームを発振させることで、一次ベッセルビームと同様に、優れた超解像性を有することができるようになる。

【0170】(実施例8) 上述したようなこの発明の顕微鏡システムでは、いくつかのフィルター素子を用いることで、発光検出器に入射する、試料からの蛍光信号のS/N比を向上させることができる。一般に、超解像顕微鏡では、検出すべき観察試料からの蛍光の他に、いくつかのバックグラウンド光が存在する。これらのバックグラウンド光としては、i) ポンプ光の散乱光、ii) イレース光の散乱光、iii) 試料以外の光学系からの蛍光がある。

【0171】i) については、ポンプ光の波長 λ_1 の散乱光であり、主に集光レンズ表面での散乱や、観察試料

を保護するカバーガラスの界面での散乱である。ii) については、i)と同様の理由によるイレース光の波長 λ_1 の散乱光である。イレース光は、ポンプ光よりも強度が強いため、蛍光検出に障害となる。iii) については、光学系のレンズやカバーガラスの硝材が理想的な無蛍光石英や蛍石であれば、これらの硝材からの250nm以上の波長領域の蛍光は存在しない。しかし、材質が悪いと、不純部やカラーセンターにより、それらからの蛍光がある。

【0172】これらのバックグラウンド光は、この発明の顕微鏡システムにおける超解像の顕微鏡本体においても発生する場合があるため、蛍光に混入して検出器に入射してしまうのを防ぎ、S/N比の向上を図ることが望ましい。図38に例示したように、基本的には、光学フィルターと空間フィルターの組み合わせでバックグラウンド光を完全に除去することができる。

【0173】通常、ポンプ光の波長 λ_1 が一番短く、イレース光の波長 λ_2 、およびS1からS0への励起起時の蛍光の波長帯域が長波長側に存在する。Rhodamine6Gは、S1からS2への吸収帯域とS1からS0への蛍光波長帯域が重複し、波長 λ_2 と検出する蛍光波長とが近接しているため、このような分子を蛍光ラベラー分子として使用する場合には、バックグラウンド光の除去を急に行うことが好ましい。

【0174】まず、i) のポンプ光の散乱光の除去は、一般にポンプ光とイレース光との波長が比較的離れているので、高分子を含んだ吸収剤をガラス基板に拡散したり、干渉膜をガラス基板の上にコートして成るシャープカットフィルターを設けることにより行うことができる。このようなシャープカットフィルターによって、たとえば図38から明らかなように、波長 λ_2 より短波長側を完全に除去できることがわかる。たとえば、誘電体多層膜を用いたものでは、最適設計を行えば、波長分割設計位置の前後大体30nm程度の間隔を置いて、これより波長幅で短波長側の光をほぼ100%除去し、反対に長波長側の光を透過させることができる。Rhodamine6Gでは、前述の図14に例示したように、蛍光測定波長領域とポンプ光とを40nm以上間隔がつけられるので、シャープカットフィルターにより、ポンプ光の散乱光を、試料からの蛍光から分離して取り除くことができる。

【0175】このようなシャープカットフィルターは、たとえば、前述の実施例4における図26に例示したように、蛍光検出器(フォトマル(14))の前に、蛍光の光路上に設置させることができる。次に、ii) のイレース光の除去は、ノッチフィルターを設けることにより行うことができる。ノッチフィルターは、誘電体多層膜を用いたフィルターであり、図38に例示したように、特定の波長のみを透過させないようにしたものである。誘電体多層膜を多く積層して、膜厚を最適化すれば、設計波長を中心に20nm程度バンド内の光を完全

(25) 101-100102 (P2001-100102A)

に除去できる。

【0176】特に、Rhodamine6G の場合には、蛍光発光領域が550～650 nmの領域に広がり、イレース光の波長が562 nmとなっているが、ノッチフィルターにより、562 nm近傍のイレース光の散乱光が検出器に入射することを防ぐことができる。また、Rhodamine6Gのように、二重共鳴吸収過程と誘導放出とを利用して試料からの発光蛍光の抑制を行う場合には、S1からS2への吸収帯域とS1からS0への発光波長帯域が重複するので、発光検出器に入射する試料からの蛍光が一部損失することとなる。しかしながら、ノッチフィルターを用いることにより、550～650 nmの領域のうち、562 nmを含む20 nm程度の狭域の蛍光が欠損するだけで、観察対象である蛍光の損失も極力少なくすることができる。

【0177】さらに、試料からの蛍光以外のバックグラウンド光をより完全に除去させるために、バンドパスフィルターを配設させることも好ましい。バンドパスフィルターは、誘電体多層膜をガラス基板にコートして成るものであり、ノッチフィルターとは反対に、特定の波長を含み、その前後の波長領域の光のみを透過させることができる。

【0178】したがって、ポンプ光とイレース光の波長と透過せず、且つ、蛍光発光波長帯域のみに透過特性のバンドパスフィルターが備えられていることにより、原理的には完全に試料からの蛍光以外の波長をカットすることができる。以上のように、シャープカットフィルター、ノッチフィルター、バンドパスフィルターを併用して、たとえば発光検出器へ試料からの発光を集光する発光集光光学系において、備えることにより、蛍光ラベラー分子が脱励起する際に発光する蛍光を、非常に優れたS/N比で検出することができる。

【0179】iii)の試料以外の光学系からの蛍光の除去については、光学系のレンズやカバーガラスの硝材の不純物やカラーセンターに起因するものであるので、理想的な合成石英（つまり無蛍光石英）や蛍石を利用すれば問題ない。このような硝材としては、合成石英の他に、 CaF_2 、 NaF 、 Na_3AlF_6 、 LiF 、 MgF_2 、 SiO_2 、 LaF_3 、 NdF_3 、 Al_2O_3 、 CeF_3 、 PbF_2 、 MgO 、 ThO_2 、 SnO_2 、 La_2O_3 、 SiO などを用いることができる。

$$I_{\text{signal}} = \int_{\lambda_{c1}}^{\lambda_{c2}} I(\lambda) d\lambda = \int_{\lambda_{c1}}^{\lambda_{c2}} T_1(\lambda) T_2(\lambda) T_3(\lambda) F(\lambda) d\lambda$$

【0186】この式において、 $F(\lambda)$ は蛍光ラベラー分子の蛍光強度であり、 λ_{c1} と λ_{c2} は発光検出器の感度域の下限波長と上限波長を示している。図38が示すように、この I_{signal} は、バックグラウンド光の混入していない、試料からの蛍光強度に対応している。なお、図39において、対物レンズ(64)を反射対物レンズ

【0180】もちろん、試料からの蛍光と試料以外の光学系からの蛍光とを分離させるフィルター光学系をも設置しておくことが望ましい。このようなフィルター光学系としては、スリットまたはピンホールなどの空間フィルターがある。図39は、フィルター光学系が備えられているこの発明の顕微鏡システムの一例を示した要部構成図である。

【0181】この図39に例示した顕微鏡システムのフィルター光学系では、遮光ボックス(62)の中において、ノッチフィルター(14)の前方に、ノッチフィルター(58)、バンドパスフィルター(59)、シャープカットフィルター(60)が順に配設されている。さらに、遮光ボックス(62)におけるダイクロックミラー(24)側の面4は、ピンホール(61)を有している。

【0182】また、調整された試料(100)のレーザー照射面側は、カバーガラス(63)によりカバーされて保護されている。このカバーガラス(63)は、たとえば上記した硝材により形成されている。このような図39の顕微鏡システムにおいて、ピンホール(23)と、空間フィルターとして機能するピンホール(61)とは、対物レンズ(64)と調整された試料(100)面に対して共焦点位置となっている。このような共焦点面に対しては、光線追跡をすると自明であるが、ポンプ光およびイレース光の集光点以外のところ、言い換えると試料面でないところで発光した蛍光は、ピンホール(61)を通過して、発光検出器であるフォトマル(14)の受光面に到達できない。

【0183】たとえば、カバーガラス(63)から発光した蛍光は対物レンズ(64)を通ると、ピンホール(61)上には結像しない。従って、結像しない大多数の蛍光は、ピンホール(61)を通過することができない。また、対物レンズ(64)面から発光した蛍光は、対物レンズ(64)レンズで直接ピンホール(61)に集光しないので、ピンホール(61)を通過せず、フォトマル(4)の受光面に到達しない。

【0184】図38のノーテーションに従えば、発光検出器に入射する蛍光強度 I_{signal} は、次式のように表すことができる。

【0185】

【数19】

とすると、レンズ硝材からの蛍光が無くなるので、よりS/N比を向上させることが可能となる。

【0187】(実施例9)図40は、実施例6における図34に例示したこの発明の顕微鏡システムに対応する電気系システムの一例を示したものである。図40に示した例では、この発明の顕微鏡システムの全系は、基本

(26) 101-100102 (P2001-100102A)

的に、パーソナルコンピュータ(66)によって制御される。

【0188】このパーソナルコンピュータ(66)は、YAGレーザーの発振、および調子されたたとえば図34における試料(100)の走査ステージである二次元移動ステージ(10)の駆動制御を行う。系のタイミングは全てパーソナルコンピュータ(66)のクロックに準拠している。このクロックは、分周器(67)により、レーザー発振可能な周波数まで分割され、分周されたクロック信号は、ゲート&ディレイジェネレータ(68)により、遅延および波形成形されて、レーザー制御用のQスイッチ信号とフラッシュランプ信号として、YAGレーザーを制御する。

【0189】レーザーショットごとの蛍光スペクトルは、CCDアレー(69)でモニターされる。具体的には、レーザーショットにより、調整された試料(100)から発光した蛍光は回折格子(70)で分光され、一次元のCCDアレー(69)により蛍光スペクトルとして検出される。CCDアレー(69)の各画素の蓄積データは、二次元移動ステージ(10)の移動およびレーザー発光と同期しながら、レーザーショットごとにパーソナルコンピュータ(66)のメモリに転送される。

【0190】パーソナルコンピュータ(66)のメモリに記憶された蛍光スペクトルデータからは、パーソナルコンピュータ(66)の数値演算処理により、特定の蛍光波長のデータだけが抽出されて、このデータによって調整された試料(100)の二次元走査画像が形成される。測定された各波長に対して二次元操作画像を画像解析することにより、単なる蛍光像を得るだけでなく、2次元組成分析をも可能となる。

【0191】さらに、水銀ランプ(31)の照射で得られる調整された試料(100)の蛍光画像は、同時にCCDカメラ(71)でモニターされ、その蛍光画像データは図時フレームメモリ(72)に蓄積できるようにになっている。このことにより、二次元走査画像とは別に、随時、調整された試料(100)の蛍光像の全体をモニターしておくことができる。この機能は、前述したように、特に、中空マイクロビームを用いたマイクロニュビュレートを行う際に大変便利である。

【0192】この他、パーソナルコンピュータ(66)は、CRT(73)およびフレームメモリ(72)を制御し、画像表示や、画像処理を随時行うことができる。このようにして形成された画像データは、たとえばCRT(73)またはビデオプリンター(74)により出力できる。この発明は以上の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能である。

【0193】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって、第一電子励起状態の分子を第二電子励起状態へ励起させるイレーズ光を、簡単にコンパクトな光学系を用

いて、優れたビームプロファイルで集光させることができ、安定性および操作性が高く、優れた超解像性を有する、新しい顕微鏡システムが提供される。また、試料へダメージを与えることなく、中空ビームであるイレーズ光を用いて試料粒子の捕獲および移動を行うことのできる、マイクロニュビュレート機能を有する、新しい顕微鏡システムも提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】分子の電子構造を例示した概念図である。

【図2】図1の分子の波長 λ_1 による第一励起状態への励起を例示した概念図である。

【図3】図1の分子の波長 λ_2 による第二励起状態への励起を例示した概念図である。

【図4】図3の第二電子励起状態から基底状態への発光を伴う脱励起過程を例示した概念図である。

【図5】第二励起状態へ発光収率の小さい分子における長解像顕微鏡の原理を例示した概念図である。

【図6】二重共鳴吸収過程を例示した概念図である。

【図7】波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射タイミングおよび第一励起状態の分子数の一例を示した図である。

【図8】波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射タイミングおよび測定タイミングの一例を示した図である。

【図9】波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射タイミングおよび測定タイミングの別の一例を示した図である。

【図10】波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射タイミングおよび測定タイミングの別の一例を示した図である。

【図11】波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射タイミングおよび測定タイミングの別の一例を示した図である。

【図12】高い励起状態からの分子の脱励起過程を例示した図である。

【図13】第一電子励起状態から第二電子励起状態へ励起する波長帯域が、第一電子励起状態から基底状態の振動準位に蛍光過程により脱励起する際の蛍光長帯域に重なりをもつ分子のエネルギーダイアグラムを例示した図である。

【図14】ローダミン6Gの分子構造式および光学的性質としての各断面積と波長との関係を例示した図である。

【図15】ベッセルビームを表現するための座標系を例示した図である。

【図16】ベッセルビームのビーム面の位相分布を例示した図である。

【図17】一次ベッセルビームの2次元強度分布を例示した図である。

【図18】位相板がイレーズ光の集光ビームに与える位相分布の一例を示した図である。

【図19】集光光学系の開口数の一例を示した図である。

【図20】実施例1のこの発明の顕微鏡システムの顕微鏡本体におけるイレーズ光集光ビーム強度および蛍光強

(27) 101-100102 (P2001-100102A)

度の一例を示した図である。

【図21】光軸周りに不連続に変化する屈折率分布を持つ位相板を例示した概念図である。

【図22】光軸周りを四分割して不連続に変化する屈折率分布を持つ位相板において、位相板がイレース光に与える位相分布を例示した概念図である。

【図23】(a) (b) は、各々、位相板の構造と光学パラメータを例示した平面図および側面図である。

【図24】実施例2のこの発明の顕微鏡システムの顕微鏡本体におけるイレース光集光ビーム強度および蛍光強度の一例を示した図である。

【図25】実施例3のこの発明の顕微鏡システムの顕微鏡本体におけるイレース光集光ビーム強度および蛍光強度の一例を示した図である。

【図26】この発明の顕微鏡システムの一例を示した要部構成図である。

【図27】環状輪帯スリットと通常のガラスレンズとが組み合わされてなる輪帯光学系の一例を示した図である。

【図28】輪帯光学系の一例である反射型対物レンズを例示した図である。

【図29】輪帯光学系の一例であるWalter型レンズを例示した図である。

【図30】(a) (b) は、各々、回折光学系の一例である透過型および反射型のフレネルゾーンプレートを示した図である。

【図31】同心円上に溝をもつ透過型回折格子を例示した図である。

【図32】アキシコン光学系の一例を示した図である。

【図33】この発明の顕微鏡システムの他の一例を示した要部構成図である。

【図34】この発明の顕微鏡システムの他の一例を示した要部構成図である。

【図35】一次ベッセルビームを直接発振できるレーザー共振器の一例を示した要部構成図である。

【図36】Nd:YAGレーザーが図35に例示したレーザー共振器を持つ場合の、この発明の顕微鏡システムの一例を示した要部構成図である。

【図37】(a) (b) (c) (d) は、各々、 $n=0$, $n=1$, $n=2$, $n=3$ の高次ビームに関する振幅分布と強度分布とを例示した図である。

【図38】各種フィルターの波長特性と検出光波長特性の関係を示した図である。

【図39】フィルター光学系が備えられているこの発明の顕微鏡システムの一例を示した要部構成図である。

【図40】図34のこの発明の顕微鏡システムに対応する電気系システムの一例を示した要部構成図である。

【符号の説明】

1 Nd:YAGレーザー

2 BBO結晶

3 ハーフミラー

4 ラマンシフター

5 ミラー

6 位相板

7 ダイクロックミラー

8 ダイクロックミラー

9 集光対物レンズ

10 二次元移動ステージ

100 調整された試料

11 蛍光集光レンズ

12 シャープカットフィルター

13 ピンホール

14, 15 フォトマル

16 輪帯スリット

17 ガラスレンズ

18 三倍波発生器

19 二倍波発生器

20, 24 ダイクロックミラー

21 偏光子

22 コンデンサーレンズ

23 ピンホール

25 対物レンズ

26 ピンホール

27 シャープカットフィルター

28 ハーフミラー

29, 30 ミラー

31 水銀ランプ

32, 33 Nd:YAGレーザー

35, 36 KTP結晶

37, 38, ハーフミラー

39 ラマンシフター

40, 41 ダイクロックミラー

42 リレーレンズ

43, 44, 45 ハーフミラー

46, 48 レンズ

47 ピンホール

49 スペクトルメーター

50 CCDカメラ結像レンズ

51 CCDカメラ

52 輪帯ミラー

53 レンズ

54 位相板

55 出力ミラー

56 Nd:YAGレーザー

57 KTP結晶

58 ノッチフィルター

59 バンドパスフィルター

60 シャープカットフィルター

61 ピンホール

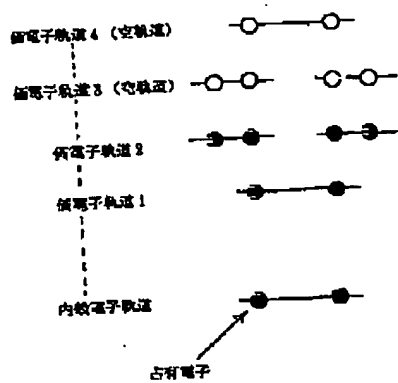
62 遮光ボックス

(28) 101-100102 (P2001-100102A)

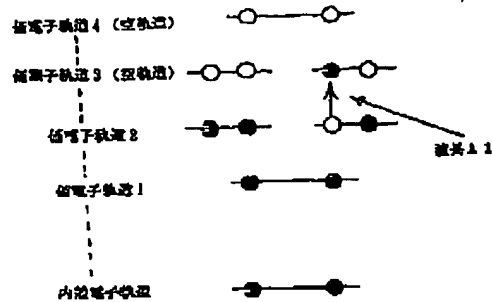
63 カバーガラス
64 対物レンズ
65 コンデンサーレンズ
66 パーソナルコンピュータ
67 分周器
68 ゲート&ディレイジェネレータ

69 CCDアレー
70 回折格子
71 CCDカメラ
72 フレームメモリー
73 CRT
74 ビデオプリンター

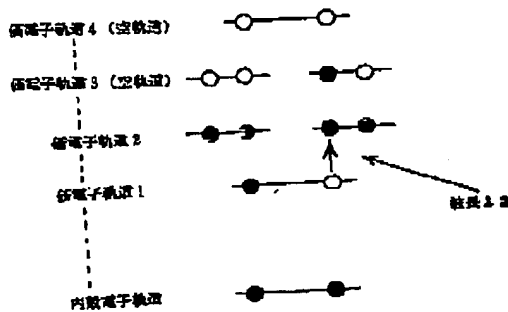
【図1】



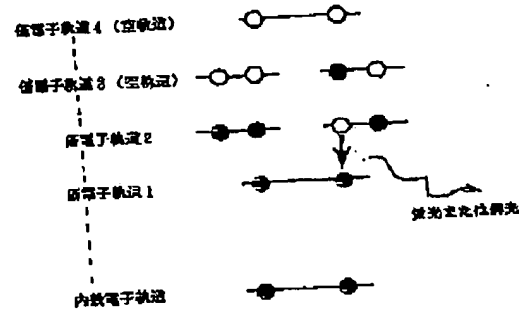
【図2】



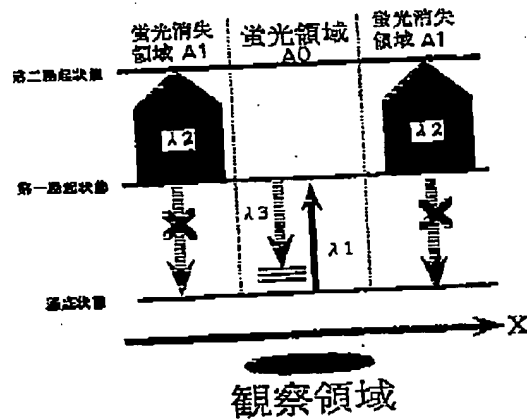
【図3】



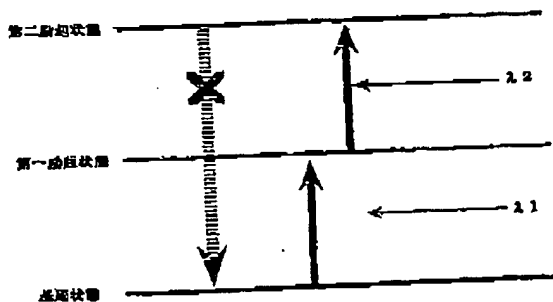
【図4】



【図6】

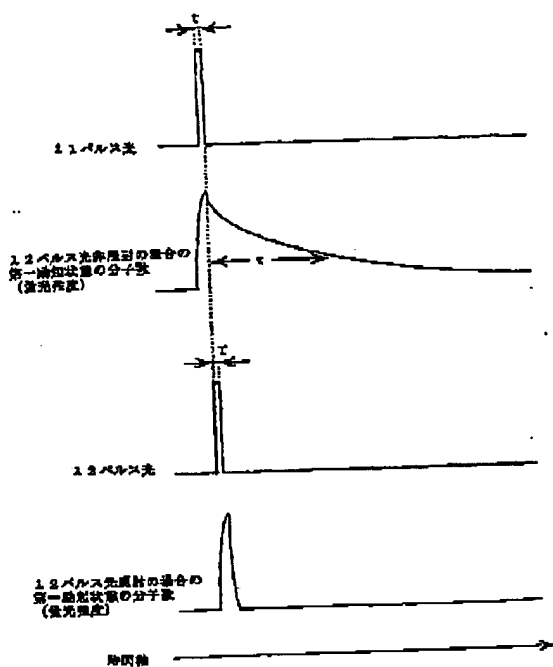


【図5】

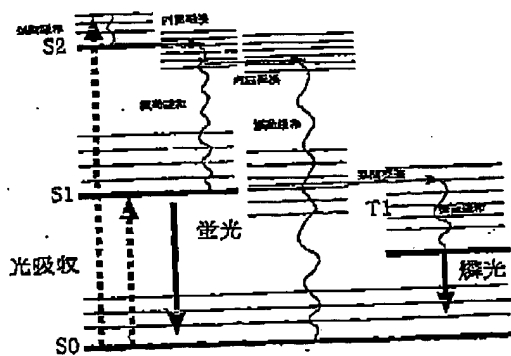


(29) 101-100102 (P2001-100102A)

【図7】

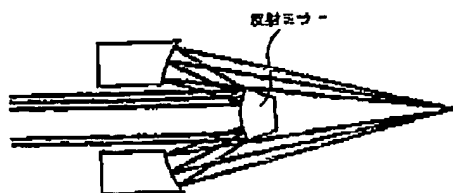


【図12】

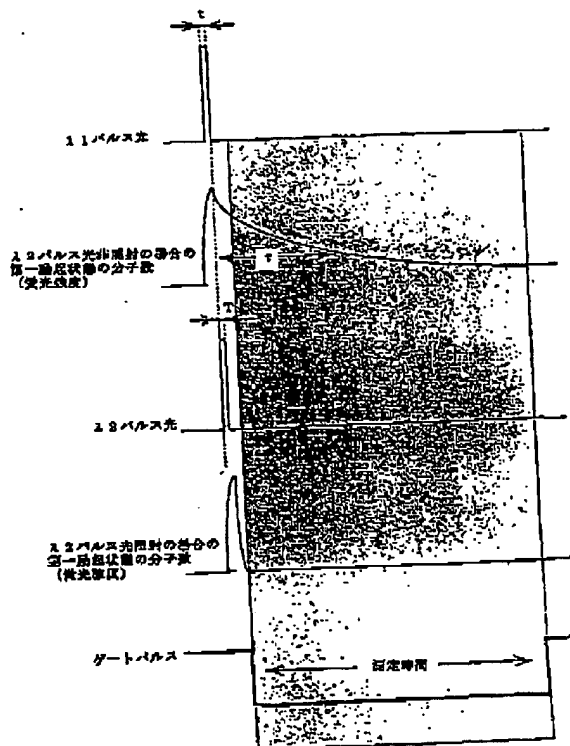


【図28】

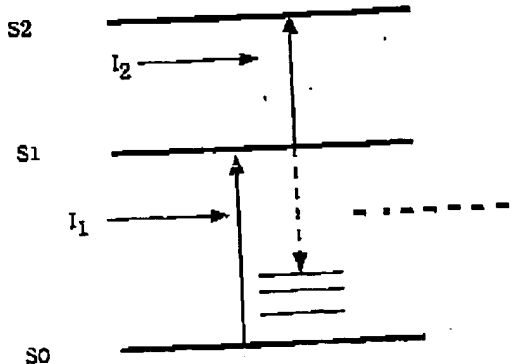
カセグレン (シュバルツシルド) 型



【図8】



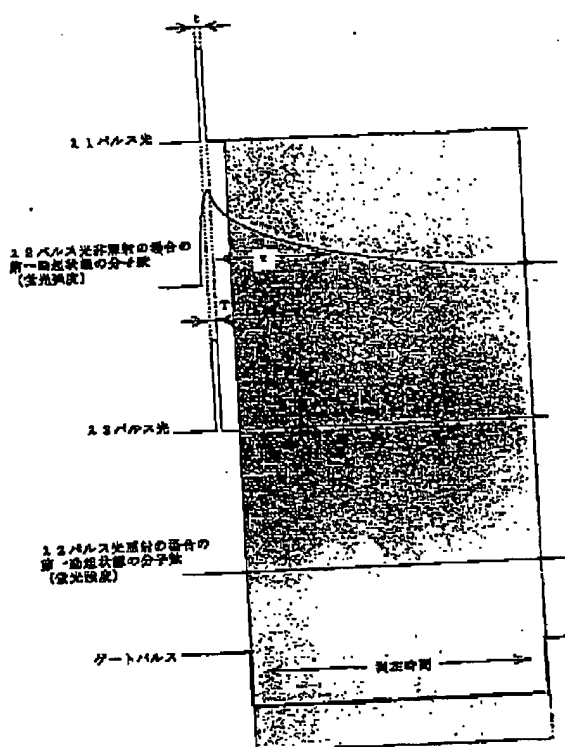
【図13】



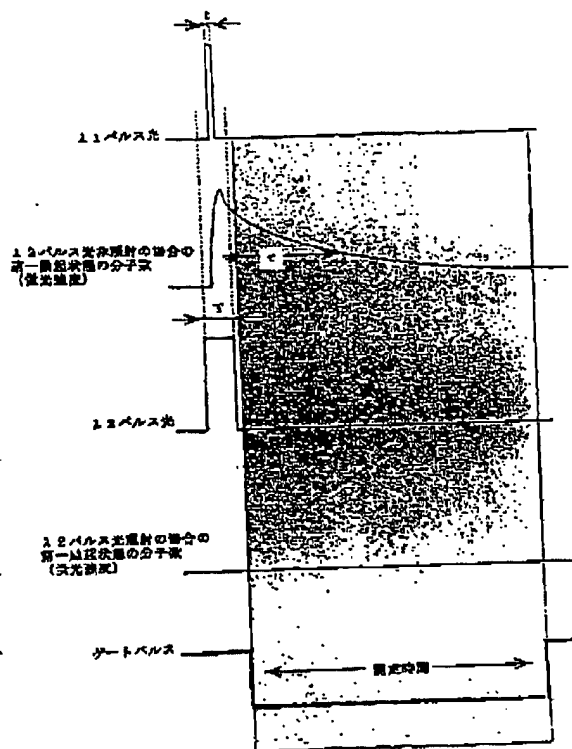
BEST AVAILABLE COPY

(B0) 101-100102 (P2001-100102A)

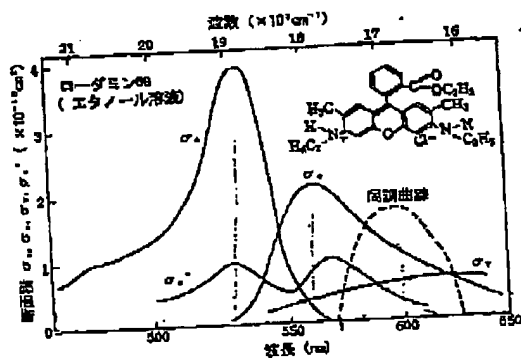
【図9】



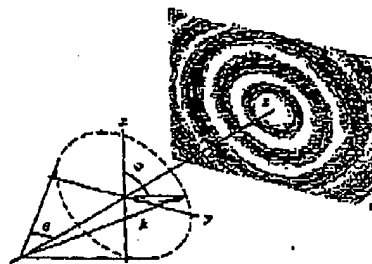
【図10】



【図14】

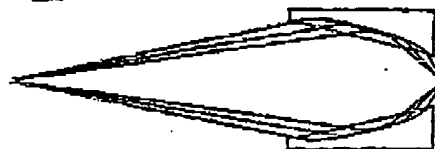


【図15】



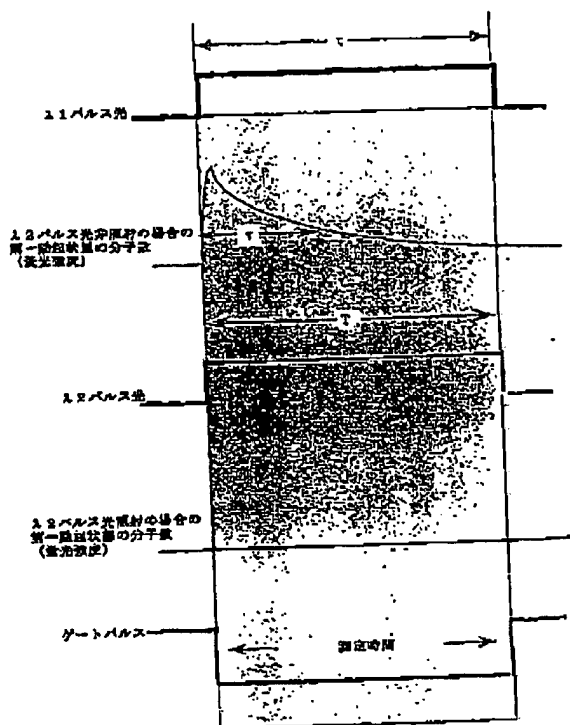
【図29】

Walter 22



(81) 101-100102 (P2001-100102A)

【図11】

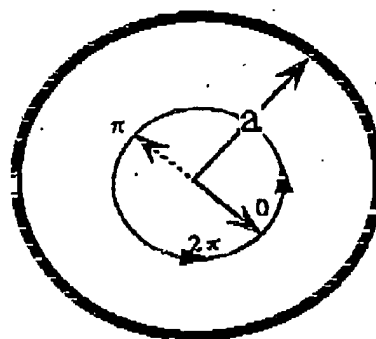


【図16】

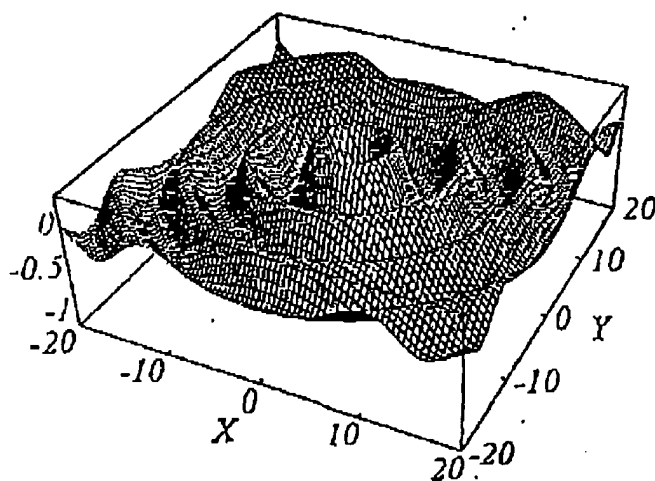
$$I(x,y) = \left| \int_{x^2+y^2 \leq r^2} \text{PSF}(x-x',y-y') \exp[-i\phi(x',y')] dx' dy' \right|^2$$

$$\text{PSF}(x,y) = \frac{2J_1(2\pi r_s)}{2\pi r_s}, \quad r_s = \frac{NA}{\lambda} \sqrt{x^2+y^2}$$

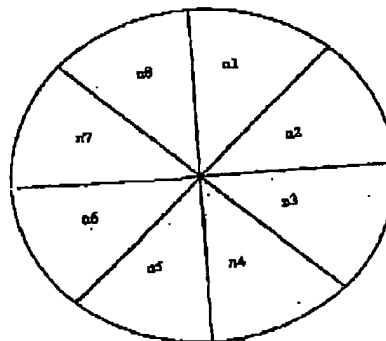
【図18】



【図17】

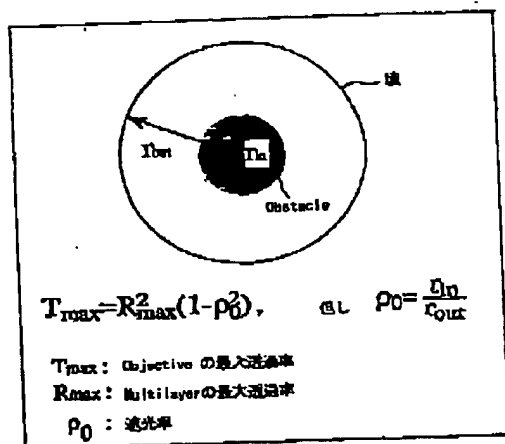


【図21】

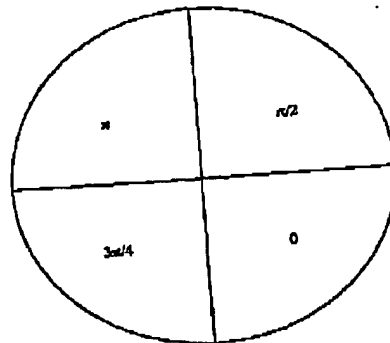


(32) 01-100102 (P2001-100102A)

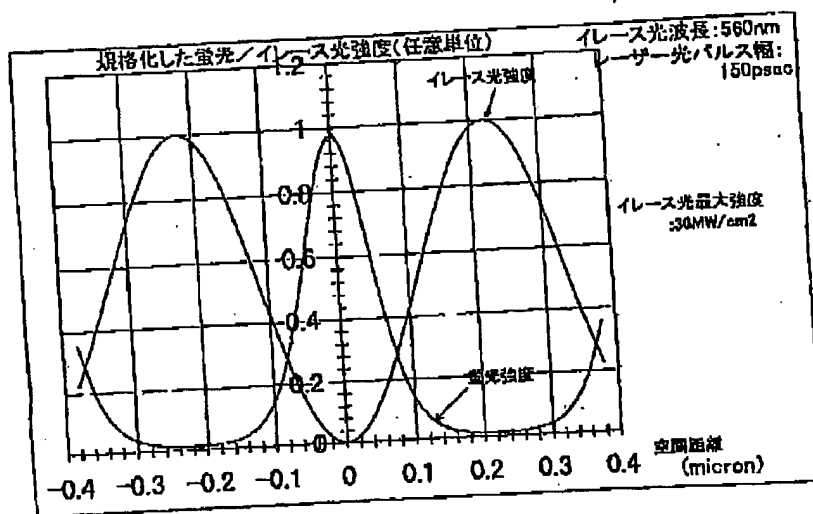
【図19】



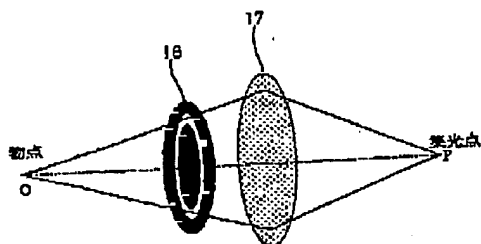
【図22】



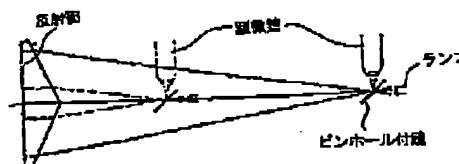
【図20】



【図27】

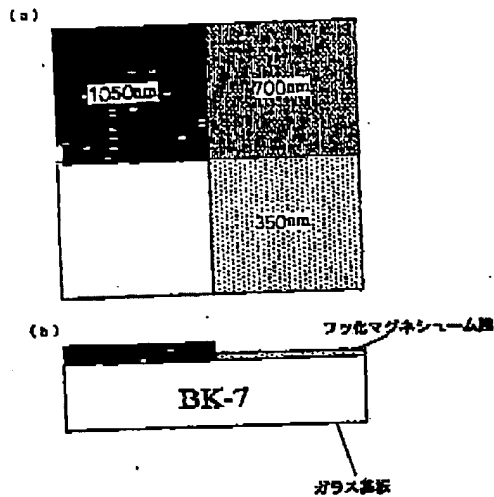


【図32】

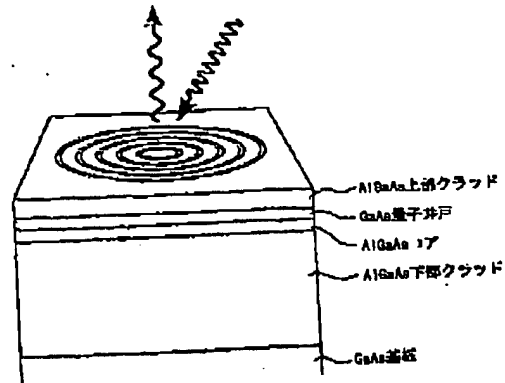


(特3) 01-100102 (P2001-100102A)

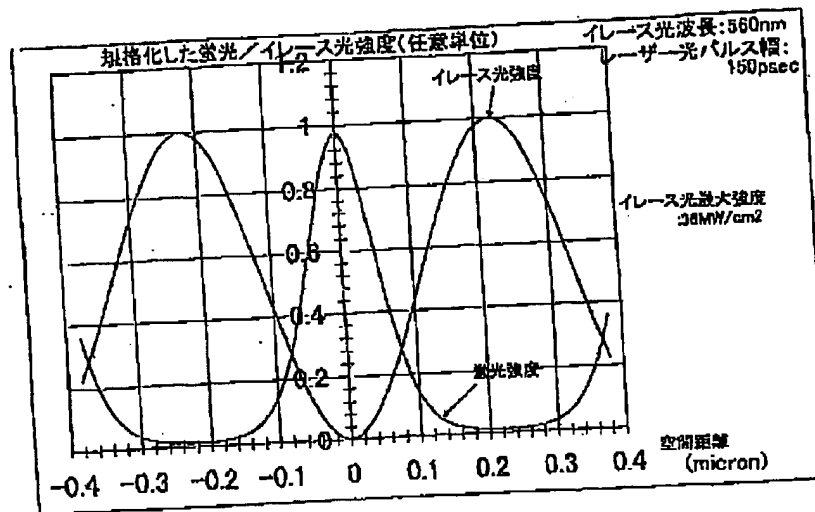
【図23】



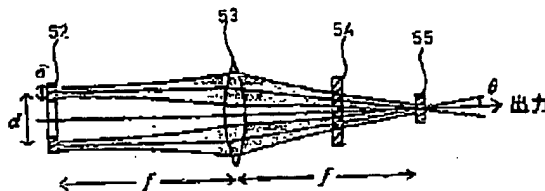
【図31】



【図24】

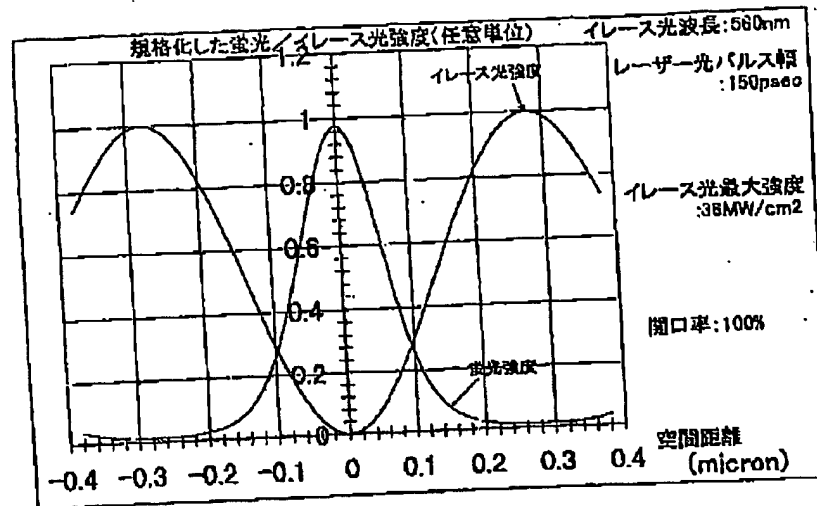


【図35】

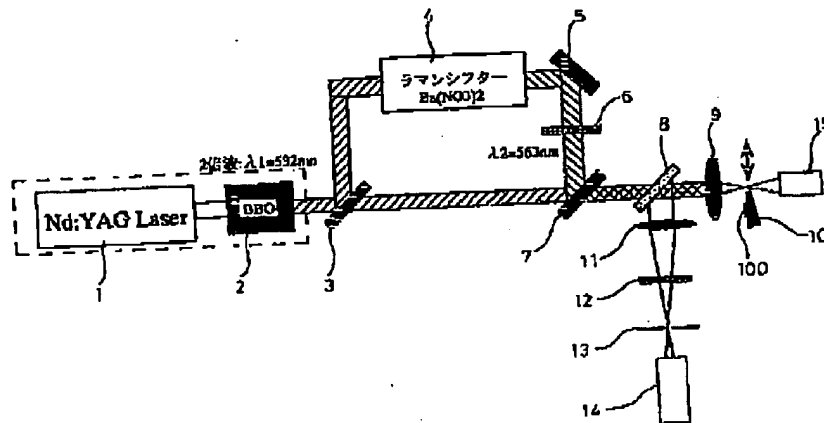


(S4) 01-100102 (P2001-100102A)

【図25】

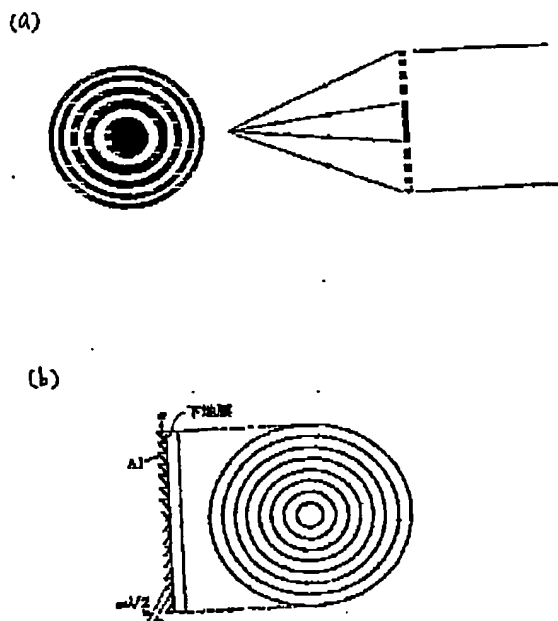


【図26】

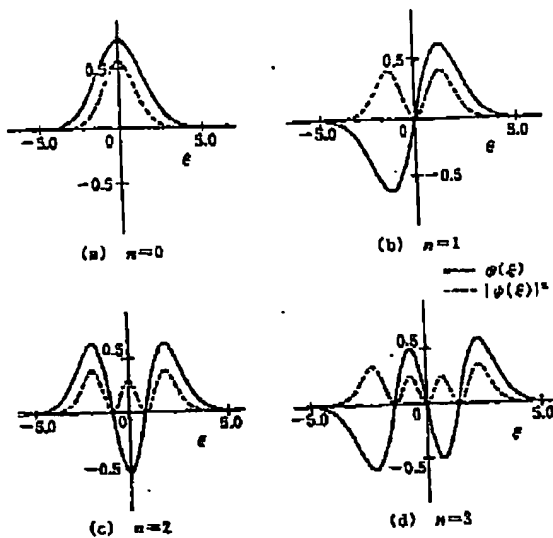


(35) 01-100102 (P2001-100102A)

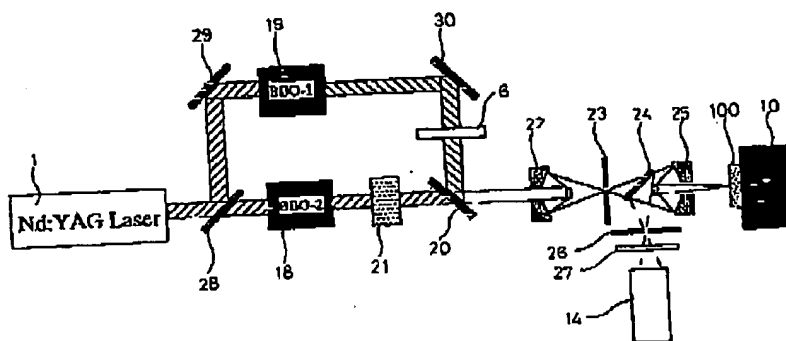
【図30】



【図37】

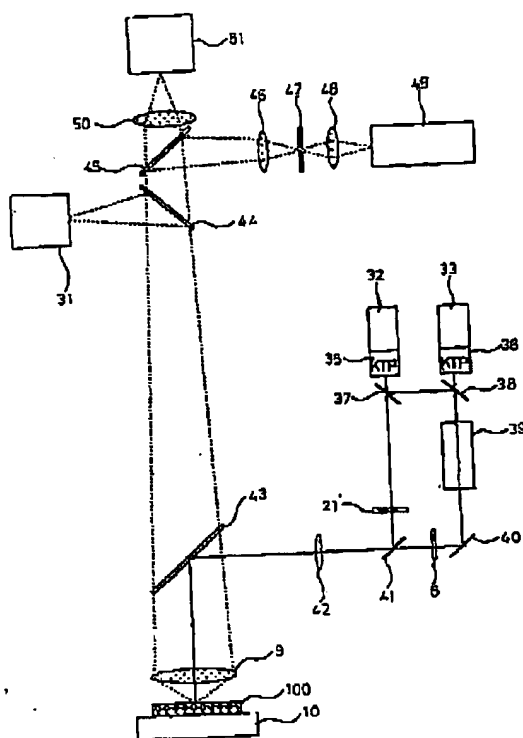


【図33】

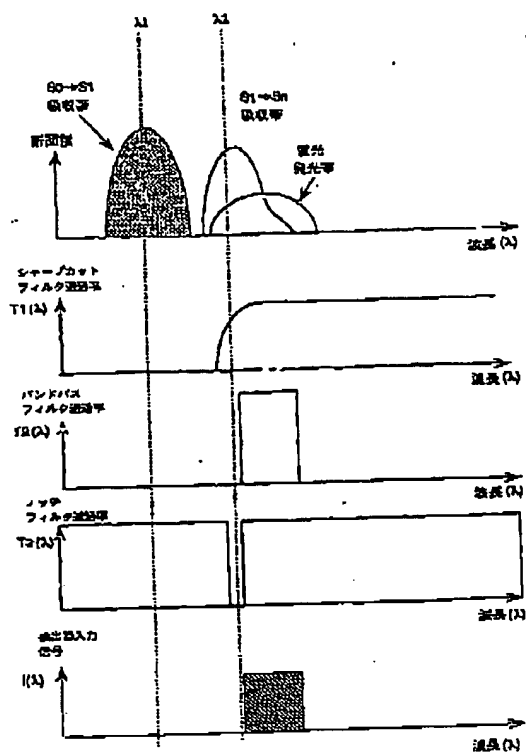


(B6) 01-100102 (P2001-100102A)

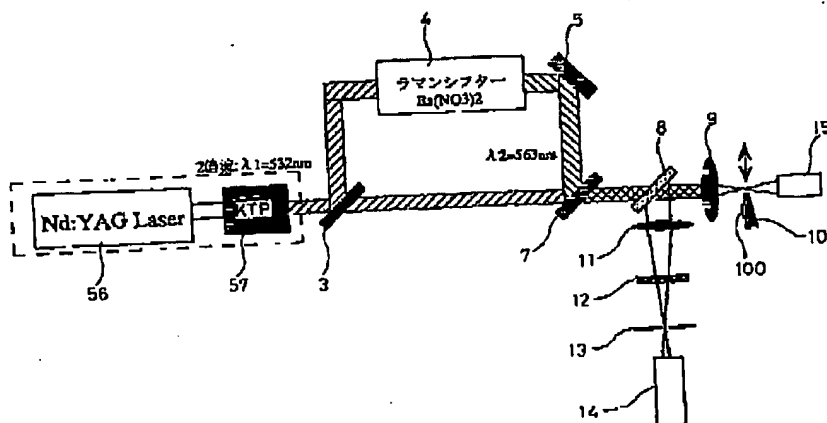
【図34】



【図38】

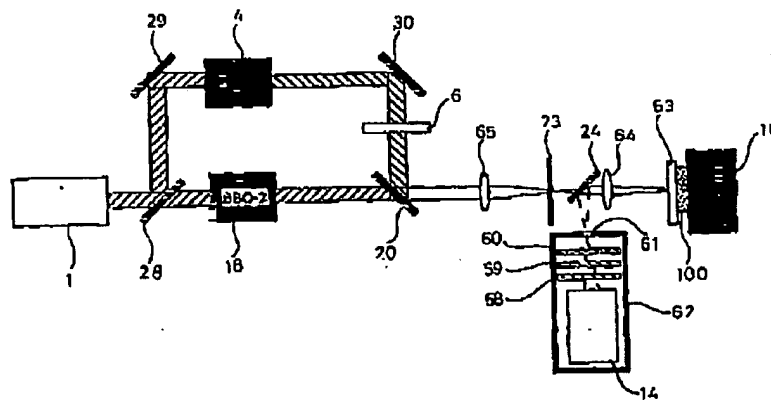


【図36】

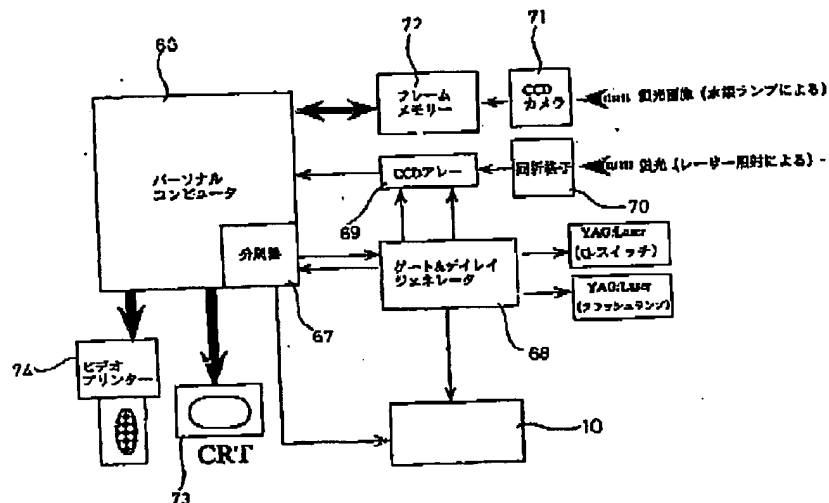


(87) 101-100102 (P2001-100102A)

【図39】



【図40】



フロントページの続き

(72) 発明者 尾松 幸茂
神奈川県横浜市戸塚区平戸 5-10-9

Fターム(参考) 2H052 AA00 AA07 AA09 AB24 AB26
AC14 AC34 AD34 AF07